



Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública



**Instituto Politécnico
de Coimbra**

AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE DA PROTEÍNA C E EXPRESSÃO DE CD64 NOS NEUTRÓFILOS COMO MARCADORES DE DIAGNÓSTICO PRECOCE NA SEPSIS

ANA CRISTINA DA SILVA OLIVEIRA

Coimbra

2011



Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública



**Instituto Politécnico
de Coimbra**

AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE DA PROTEÍNA C E EXPRESSÃO DE CD64 NOS NEUTRÓFILOS COMO MARCADORES DE DIAGNÓSTICO PRECOCE NA SEPSIS

Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Especialização de Hematologia e Imunologia Clínico-Laboratorial, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Letícia de Sousa Ribeiro, Professora Adjunta convidada da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra e coorientação da Mestre Teresa de Jesus Semedo Fidalgo, Equiparada a Professora Adjunta da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra.

Agradecimentos

À Doutora Leticia Ribeiro um agradecimento muito especial por me ter concedido a oportunidade de realizar este trabalho no Serviço de Hematologia do Hospital Pediátrico - Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, EPE. Agradeço o empenho, esforço e dedicação que colocou na correcção deste trabalho, bem como pelas sugestões e enorme orientação dadas.

À Dra Natália Martins, pela disponibilidade, orientação e pelo seu espírito crítico que contribuíram significativamente para a qualidade deste trabalho, bem como pela permissão da realização do trabalho na Unidade de Hemostase Laboratorial.

À Dra Teresa Fidalgo pela enorme disponibilidade, sabedoria e pelos ensinamentos constantes durante todo o processo de orientação científica desta dissertação. O meu mais profundo agradecimento por todo o apoio, compreensão e pelo contributo imprescindível na realização desta dissertação.

À Patricia Martinho pela disponibilidade e ensinamentos nas técnicas de biologia molecular.

À Margarida Coucelo, pela enorme disponibilidade e ajuda na citometria, bem como pelas explicações técnicas, comentários e sugestões.

Ao Rogério Barreira, pelas explicações técnicas relativas ao analisador hematológico, pela revisão, e por todo o apoio e compreensão.

Agradeço à Elsa Gonçalves e à Dalila Marques e aos restantes colegas que colaboraram na recolha e separação das amostras.

À Dra Cristina Menezes, pela permissão da realização da técnica de citometria no sector de Citometria de Fluxo e à Dra Manuela Fortuna, Susana Santos e Sara Domingues, pela colaboração.

À Dra Sofia Beirão da UCI, pela disponibilidade e facultação dos dados clínicos

Júri

Mestre Fernando José Figueiredo Agostinho d'Abreu Mendes, professor adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Professora Doutora Paula Cristina Santos Luxo Maia Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Professora Doutora Maria Letícia de Sousa Ribeiro, Professora Adjunta convidada da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Mestre Teresa de Jesus Semedo Fidalgo, Equiparada a Professora Adjunta da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Resumo

Introdução: Na investigação da fisiopatologia dos distúrbios hemostáticos de doentes com sepsis, a proteína C (PC) tem despertado um interesse particular devido ao seu papel central nos sistemas da coagulação e fibrinólise. Na sepsis há diminuição dos níveis de PC, resultante do aumento de consumo, degradação e/ou diminuição de síntese, e os níveis baixos têm sido apontados como preditores de severidade e grau de disfunção orgânica.

Na região promotora do gene da PC (PROC) há dois polimorfismos funcionais, -1654C/T e -1641A/G, que foi demonstrado que condicionam os níveis de PC em indivíduos normais e, mais recentemente, tem vindo a ser discutido o seu papel como factor agravante na sepsis.

A expressão do CD64 nos neutrófilos tem sido proposta como um indicador laboratorial de infecção severa e sepsis. O receptor membranar definido pelo anticorpo monoclonal CD64 é um receptor de elevada afinidade para imunoglobulinas (FcγRI) e é expresso nos monócitos maduros e em níveis muito baixos nos neutrófilos não activados. O aumento da expressão do CD64 nos neutrófilos parece ser um marcador sensível de infecção e sepsis.

Objectivos: O objectivo principal deste estudo foi analisar, nos doentes com sepsis, alterações precoces dos níveis da PC e da expressão do CD64 nos neutrófilos e pesquisar a sua correlação com a severidade e prognóstico da doença. Foi ainda analisada a correlação entre os polimorfismos, -1654C/T, -1641A/G e -1476A/T na região promotora do gene PROC e os níveis de PC e a severidade da sepsis.

Material & Métodos: Trinta e sete doentes com sepsis foram agrupados em 3 grupos, consoante a severidade: 1) sepsis (n = 10), 2) sepsis severa (n = 8), 3) choque séptico (n = 19). Aquando da admissão na Unidade de Cuidados Intensivos (ICU) foram quantificados os níveis de proteína C, fibrinogénio, d-dímeros, procaltitonina e proteína C reactiva e a expressão de CD64 nos neutrófilos (pelas metodologias de citometria de fluxo convencional e do CD-Sapphire). Posteriormente foram pesquisados os polimorfismos da região promotora do gene PROC. Cinquenta voluntários saudáveis foram estudados como grupo controlo para determinação dos níveis de PC, análise do genótipo da região promotora PROC e determinação dos níveis de expressão do CD64 nos neutrófilos. Para análise estatística dos resultados foi utilizado o programa Graph Pad Prism versão 5.00.

Resultados: Observou-se uma diminuição dos níveis de PC com o agravamento dos estadios de sepsis (p=0.0018), com níveis mais baixos no grupo de doentes com choque séptico. No grupo controlo verificou-se uma diferença estatisticamente significativa (-16%; p=0.0375) nas médias dos níveis de PC entre os indivíduos com os genótipos TT/AA/AA (116%) e CC/GG/TT (100%). Relativamente aos doentes com sepsis, observou-se uma diferença estatisticamente significativa na média dos níveis de PC entre o grupo do genótipo CC/AA/AA (81%) comparado aos grupos com os genótipos TT/AA/AA (35.5%; p=0.0350) e CC/GG/TT (30%; p=0.0009).

A expressão de CD64 nos neutrófilos, por ambas as metodologias, está aumentada nos doentes com sepsis em relação ao grupo controlo (diferença com significado estatístico, p<0.0001); o número de moléculas de CD64 por célula (por citometria de fluxo) aumenta gradualmente com a severidade da sepsis, com níveis mais elevados no choque séptico.

Conclusão: Neste grupo de doentes com sepsis, avaliados no momento em que deram entrada na UCI, os níveis de PC e a expressão de CD64 nos neutrófilos permitem confirmar o diagnóstico; o número de moléculas de CD64 /célula correlacionam-se significativamente com a severidade da sepsis, fornecendo uma informação adicional fidedigna para a avaliação da gravidade do quadro clínico.

Este estudo confirmou a correlação entre os polimorfismos -1654C/T e -1641A/G da região promotora do gene PROC e os níveis plasmáticos de PC no grupo controlo. No que diz respeito aos doentes com sepsis, embora estes resultados ainda sejam preliminares e o estudo ainda esteja em curso, os genótipos CC/GG, TT/AA e CT/AG parecem estar associados a estadios de maior severidade de sepsis.

Palavras-chave sepsis; proteína c; promotor; polimorfismos; CD64; infecção; neutrófilos;

Abstract

Introduction: In the pathophysiology of hemostatic disorders in patients with sepsis, protein C (PC) has attracted particular interest due to its central role in coagulation and fibrinolysis systems. In sepsis a decrease in PC levels is observed has result of increased consumption, degradation and/or decreased synthesis, and low levels in PC have been suggested as predictors of severity and degree of organ dysfunction.

In Protein C gene promoter region (PROC), there are two functional polymorphisms, -1654C/T and -1641A/G, that had been shown to affect the levels of PC in normal subjects and more recently their role as an aggravating factor in sepsis has been discussed.

Neutrophil CD64 expression has been proposed as an improved laboratory indicator of severe infection and sepsis. CD64 is a membrane high-affinity receptor (FcγRI) found in monocytes and is only expressed at low levels in neutrophils. Upregulation of CD64 expression in neutrophils appears to be a sensitive marker for infection and sepsis.

Objectives: In patients with sepsis, measure early changes in protein C levels and in neutrophil CD64 expression and correlate with severity and clinical outcome. Establish a correlation between three polymorphic sites, -1654C/T, -1641A/G and -1476A/T in the protein C promoter region with plasma protein C levels and sepsis severity.

Material & Methods: In 37 septic patients (sepsis (n = 10), severe sepsis (n = 8), and septic shock (n = 19)) admitted in an Intensive Care Unit (ICU) were determined protein C levels, fibrinogen, d-dimer, procalcitonin and C-protein reactive; neutrophils CD64 expression quantified by flow cytometry and in a CD-Sapphire. Polymorphisms of the promoter region of the gene PROC were evaluated by sequencing. Fifty healthy volunteers acted as control group for determination of protein C levels, quantification of neutrophils CD64 and for genotype analysis of the promoter region PROC. Statistical analysis using Graph Pad Prism version 5.00.

Results: A decrease in plasma PC levels was observed with aggravation of the septic stages (p=0.0018) with lower levels in septic shock group. A statistical significant difference (-16%; p=0.0375) in mean protein C levels was observed between individuals with the TT/AA/AA (116%) and CC/GG/TT (100%) genotypes in control group. There was notable difference in mean protein C levels of septic patients between the group of genotype CC/AA/AA (81%) compared to TT/AA/AA (35.5%; p=0.0359) and CC/GG/TT (30%; p=0.0009) genotypes.

Concerning neutrophils CD64 expression, with both methodologies, we observed an upregulation of CD64 in patients with sepsis compared with healthy controls (with statistical significant difference, p<0.0001); the number of neutrophil CD64 molecules per cell (by flow cytometry) increases with the severity of sepsis, with the highest levels in septic shock.

Conclusions: In this group of patients with sepsis, assessed when admitted to the ICU, the levels of PC and neutrophil CD64 allowed to confirm the diagnosis. PC levels and the number of CD64 molecules/cell were significantly correlated with the severity of sepsis, providing additional information for the reliable assessment of severity of the clinical condition.

This study confirms the link between the -1654C/T and -1641A/G polymorphisms in PC gene promoter and circulating PC levels in control group. Concerning septic patients, although these results are preliminary, and the study is still ongoing, the CC/GG, TT/AA and CT/AG genotypes may be associated with more severe states of sepsis.

Keywords

sepsis; protein c; promoter; polymorphisms; CD64; infection; neutrophils;

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
<i>Actividade anticoagulante da APC.....</i>	<i>2</i>
<i>Modelação da expressão génica pela APC</i>	<i>2</i>
<i>Actividade anti-inflamatória da APC.....</i>	<i>3</i>
<i>Actividade anti-apoptótica da APC.....</i>	<i>4</i>
<i>Estabilização da barreira endotelial mediada pela APC.....</i>	<i>4</i>
<i>Sepsis e proteína C activada</i>	<i>4</i>
<i>Antigénio CD64 nos neutrófilos</i>	<i>6</i>
<i>Expressão de CD64 nos neutrófilos como biomarcador de infecção e sepsis.....</i>	<i>7</i>
OBJECTIVOS.....	9
PROTEIN C LEVELS AND NEUTROPHIL CD64 EXPRESSION AS A SEPSIS BIOMARKERS	10
DISCUSSÃO	33
CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS	41

LISTA E ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Activação da proteína C e actividades da proteína C activada (APC).	3
Figura 2 Estado procoagulante nos doentes com sepsis.	5

LISTA E ÍNDICE DE GRÁFICOS

Graphic 1 Boxplot summary of PC plasma levels in septic patients (Sepsis, Severe Sepsis and Septic Shock)..	18
Graphic 2 Scatter dot plot summary the distribution of PC plasma levels in septic patients (Sepsis, Severe Sepsis and Septic Shock).....	18
Graphic 3 A box plot of the CD64 results for controls and three patient groups: sepsis, severe sepsis and septic shock.	24
Graphic 4 Relationship between CD64 expression molecules per cell and CD64 expression AFU in controls and septic patients.....	25
Graphic 5 Relationship between CD64 expression molecules per cell and protein C activity levels in septic patients.....	25
Graphic 6 PCT (left panel) and CRP (right panel) levels in septic patients (<24 h from clinical onset): Sepsis (n=10), Severe Sepsis (n=8) and Septic Shock (n=19)..	26
Graphic 7 Relationship between CD64 expression molecules per cell and PCT levels in septic patients.....	27

LISTA E ÍNDICE DE TABELAS

Table 1 Coagulation markers: PC, Fibrinogen, D-Dimer and Platelets Count in Sepsis, Severe Sepsis and Septic Shock.....	18
Table 2 PROC polymorphisms -1654C/T, -1641A/G and -1476A/T and the allelic frequencies in controls and septic groups (n = number of individuals).....	19
Table 3 Distribution of PROC haplotypes -1654C/T, -1641A/G and -1476A/T frequencies among controls and the three septic patients groups;	20
Table 4 Mean PC activity levels in patients (n=37) and controls (n=50) with the 11 different PROC genotypes (-1654 /-1641 /-1476).....	21
Table 5 Mean PC Activity Levels in controls and patients with 8 different genotype combination (-1654 /-1641)	22
Table 6 Neutrophil CD64 expression (molecules per cell and Arbitrary Fluorescent Units (AFU)) in group of controls and septic patients (Sepsis, Severe Sepsis and Septic Shock).....	23
Table 7 Optimum diagnostic cutoff level, diagnostic accuracy with 95% confidence interval (CI) determined by the area under the ROC curve (AUC), sensitivity, and specificity for given cutoff levels of CD64 molecules per cell and AFU at the time of suspected sepsis or infection.	23

LISTA DE ABREVIATURAS

ACCP/SCCM - *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine*

AFU - *arbitrary fluorescent units*

APC (*activated protein C*) - proteína C activada

AUC (*area under the curve*) - área sob a curva

C4bBP (*C4b-binding protein*)

CD64 (*cluster of differentiation-64*)

CD-Sapphire (*cell dynn sapphire*)

CRP (*C-reactive protein*) - proteína C reactiva

DIC (*disseminated intravascular coagulation*) - coagulação intravascular disseminada

DNA (*deoxyribonucleic acid*) - ácido desoxirribonucleico

dNTP (*deoxyribonucleotide triphosphates*)

EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*) - ácido etilenodiamino tetra-acético

EPCR (*endothelial protein C receptor*) - receptor endotelial da proteína C

FITC (*fluorescein isothiocyanate*) - isotiocianato de fluoresceína

G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) - factor estimulador de colónias
granulócitos

HLA-DR (*human leukocyte antigens*)

ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) - molécula de adesão intracelular-1

ICU (*intensive care unit*) - unidade de cuidados intensivos

IFN- γ (*interferon-gamma*) - interferon gama

IL (*interleukin*) - interleucina

IQR (*interquartile range*)

MESF (*molecules of equivalent soluble fluorochrome*)

MFI (*mean fluorescence intensity*) - média de intensidade de fluorescência

NF κ B (*nuclear transcription factor κ B*) - factor de transcrição nuclear κ B

NPV (*negative predictive value*) - valor preditivo negativo

PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*) - inibidor do activador do plasminogénio

PAR (*protease-activated receptor*) - receptores de protease activada

PC (*protein C*) - proteína C

PCR (*polymerase chain reaction*)

PCT (*procalcitonin*) - procalcitonina

PE (*phicoeritrin*) - ficoeritrina

PLT (*platelets*) - plaquetas

PMNs (*polymorphonuclear cells*) - células polimorfonucleares

PPV (*predictive positive value*) - valor preditivo positivo

PS (*protein S*) - proteína S

ROC - *receiver-operator characteristics*

S1P (*sphingosine-1-phosphate*) - esfingosina-1-fosfato

sEPCR (*soluble form of endothelial protein C receptor*) - fracção solúvel do receptor endotelial da proteína C

SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*) - *síndrome de resposta inflamatória sistémica*

SNPs (*single nucleotide polymorphism*) - polimorfismo de um único nucleótido

SphK-1 (*sphingosine kinase 1*) - esfingosina cinase 1

TAFI (*thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*) - inibidor da fibrinólise activado pela trombina

TF (*tissue factor*) - factor tecidual

TM (*thrombomodulin*) - trombomodulina

TNF α (*tumor necrosis factor-alpha*) - factor de necrose tumoral-alfa

TVP - trombose venosa profunda

VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) - molécula de adesão vascular-1

INTRODUÇÃO

As infecções bacterianas são a maior causa de morbidade e mortalidade no mundo (1). Se a resposta imune é inadequada, uma infecção bacteriana pode causar uma síndrome de resposta inflamatória sistémica (SIRS - *Systemic Inflammatory Response Syndrome*), que pode progredir para formas mais severas de sepsis, culminando no choque séptico com falência multiorgânica e até mesmo morte.

Sepsis é definida como uma síndrome de resposta inflamatória sistémica na suspeita ou na presença de uma infecção documentada. Está associada a modificações hemodinâmicas, distúrbios da microcirculação e alterações celulares que levam a um desequilíbrio entre o fluxo sanguíneo e os requerimentos metabólicos tecidulares e à disfunção de múltiplos órgãos. A sepsis, de acordo com o *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine* (ACCP/SCCM), é categorizada em I) SIRS, II) sepsis, III) sepsis severa e IV) choque séptico. A severidade e o grau de disfunção orgânica durante a sepsis são expressas pelos scores *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation* (APACHE II) e *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA) (2,3). Têm sido amplamente estudados biomarcadores que possam contribuir para o diagnóstico precoce de sepsis, para a avaliação da sua severidade e para a monitorização das respostas terapêuticas.

É actualmente bem conhecido que inflamação e distúrbios da coagulação ocorrem concomitantemente na sepsis desempenhando papéis fundamentais na patogénese da doença. As vias da inflamação e da coagulação estão intimamente interligadas: a inflamação leva à activação da coagulação que, por sua vez, afecta consideravelmente a actividade inflamatória (4-8). É reconhecido o papel central que a activação da proteína C (PC) desempenha na sepsis severa (9).

A PC é uma serina-protease da família das glicoproteínas vitamina K-dependentes, sintetizada maioritariamente no fígado sob a forma de zimogénio com uma única cadeia polipeptídica. Após modificações pós-translacionais 90-95% do zimogénio circulante é convertido num heterodímero constituído por uma cadeia leve ligada por pontes dissulfito a uma cadeia pesada (domínio serina-protease); os restantes 5-10% circulam como cadeia simples (9,11). A PC é codificada pelo gene PROC, localizado no braço longo do cromossoma 2 (2q13-14). É um gene de 10802 pares de bases, com 9 exões e 8 intrões e que codifica uma proteína de 419 aminoácidos (12-14).

Ao contrário dos outros anticoagulantes naturais, a PC faz parte de um sistema *on demand* que pode amplificar a resposta anticoagulante à medida que a resposta procoagulante aumenta (5). A activação fisiológica da PC pela trombinha ocorre na

superfície da célula endotelial e envolve 2 receptores membranares, a trombomodulina (TM) e o receptor endotelial da PC (EPCR) (15). À medida que se forma, a trombina em excesso liga-se à TM, formando um complexo enzimático que modifica a especificidade da trombina para substratos macromoleculares e inibidores. Esta interacção entre a trombina e a TM reduz a função procoagulante da trombina, mas aumenta a taxa de activação da PC, pois o complexo trombina-TM rapidamente converte a PC na sua forma activa, a proteína C activada (APC). A taxa de activação aumenta 1000 vezes quando a trombina se liga à TM e ainda aumenta 10 vezes mais, quando o EPCR liga a PC à superfície endotelial e a apresenta ao complexo trombina-TM (9,17).

Actividade anticoagulante da APC

As propriedades anticoagulantes da APC envolvem, principalmente, a inactivação proteolítica irreversível dos factores Va (FVa) e VIIIa (FVIIIa), bloqueando a geração de trombina, na presença de múltiplos co-factores, como a proteína S (PS), FV, lipoproteínas de alta densidade, fosfolípidos aniónicos e glicosfingolípidos (Figura 1). Neste ponto, e uma vez que a geração de APC é estritamente controlada pela geração de trombina, a activação da PC cessa quando a trombina é inibida. A APC pode aumentar a actividade fibrinolítica pela inactivação do inibidor do activador do plasminogénio (PAI-1) e da formação da plasmina, limitando assim o efeito proinflamatório da fibrina (11,17-21). Além disso, a APC, através da sua capacidade limitante da geração de trombina, atenua a activação de um inibidor da fibrinólise, o inibidor da fibrinólise activado pela trombina (TAFI - *Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor*) (9).

Além da sua actividade anticoagulante, a APC, também exerce múltiplos efeitos citoprotectores que incluem: 1) alteração de perfis da expressão génica; 2) actividade anti-inflamatória; 3) actividade anti-apoptótica e 4) protecção da função da barreira endotelial (15). Estes efeitos citoprotectores da APC são mediados pelo receptor EPCR e receptores de protease activada (PAR), receptores associados a proteína G, especialmente o PAR-1 (Figura 1).

Modelação da expressão génica pela APC

Estudos dos padrões de perfis da expressão génica revelaram a modulação pela APC da expressão de genes envolvidos na inflamação e apoptose, com efeito geral na diminuição da regulação das vias pro-inflamatórias e pro-apoptóticas e aumento dos mecanismos anti-inflamatórios e anti-apoptóticos (11,15,22)

A APC suprime o factor de transcrição nuclear κ B (NF κ B) reduzindo directamente a sua expressão e actividade funcional, o que se vai traduzir na inibição da sinalização por citocinas e supressão da expressão de moléculas de adesão dependente-TNF α (15,22).

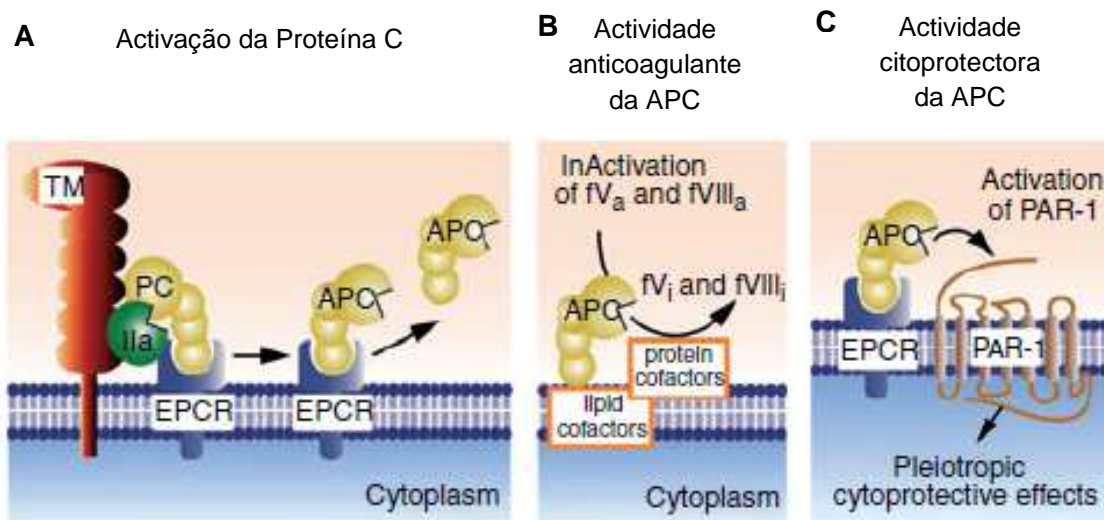


Figura 1 Activação da proteína C e actividades da proteína C activada (APC). (A) Receptores da célula endotelial, trombomodulina (TM) e o receptor endotelial da proteína C (EPCR) são necessários para uma activação eficiente da PC pela trombina (IIa). A dissociação da APC do EPCR permite a actividade anticoagulante da APC (B) enquanto que a retenção da APC ligada ao EPCR permite que esta exerça múltiplas actividades celulares (C). (B) A APC exerce a sua actividade anticoagulante quando ligada à superfície celular por inactivação proteolítica dos factores Va (FVa) e VIIIa (FVIIIa). (C) Os múltiplos efeitos citoprotectores da proteína C activada (APC), que envolvem efeitos directos da APC sob as células, requerem os receptores celulares EPCR e PAR-1. Estas actividades incluem a alteração de perfis da expressão génica mediada pela APC, actividade anti-inflamatória, actividade anti-apoptótica e protecção da função da barreira endotelial. (adaptado de Mosnier, Zlokovic and Griffin, 2007)

Actividade anti-inflamatória da APC

Actividade anti-inflamatória da APC pode ser dividida nos seus efeitos sobre as células endoteliais e sobre os leucócitos. Na célula endotelial a APC inibe a libertação de mediadores inflamatórios e diminui a expressão de moléculas de adesão vascular (como ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin), reduzindo assim a adesão leucocitária e a infiltração dos tecidos e limitando o dano ao tecido subjacente. Adicionalmente a APC protege e mantém a função da barreira endotelial e reduz o potencial quimiotáctico de vários agentes.

Os mecanismos que explicam os efeitos anti-inflamatórios da APC por acção nos leucócitos não são completamente conhecidos. Contudo, a APC inibe a libertação de mediadores inflamatórios pelos leucócitos, como o TNF α e a IL-1 β , atenuando a iniciação de respostas inflamatórias sistémicas. Esta capacidade pode reduzir a “tempestade de citocinas” associada à sepsis (15,17,23-24).

Actividade anti-apoptótica da APC

A APC manifesta actividade anti-apoptótica tanto *in vitro* como *in vivo*. Até ao momento ainda não foram identificados alvos intracelulares específicos para a APC que mediem a inibição da apoptose. No entanto, esta actividade da APC parece estar, pelo menos em parte, dependente da modulação da expressão de alguns genes. Sabe-se que a sinalização através desta via inibe as proteínas pro-apoptóticas p53 e Bax, mantém os níveis da proteína anti-apoptótica Bcl-2, inibe a activação do iniciador das caspases assim como a activação do efector das caspases. Assim, a APC reduz muitos aspectos característicos da apoptose: degradação do DNA, activação da caspase-3 e translocação da fosfatidilserina para a membrana celular externa (11,15,22,24).

Estabilização da barreira endotelial mediada pela APC

A disfunção da barreira endotelial é um factor chave na patogénese da inflamação. Especificamente, o aumento da permeabilidade endotelial promove edema e hipotensão, e assim, promove a inflamação, lesão pulmonar e falência de órgãos. A APC induz efeitos de protecção da barreira endotelial via EPCR dependente da activação do PAR-1, indução da esfingosina cinase-1 (SphK-1), e aumento de regulação da formação de esfingosina-1-fosfato (S1P) via esfingosina cinase, que aumenta a integridade da barreira endotelial através da reorganização do citoesqueleto e redução da permeabilidade (15,19,25).

Sepsis e proteína C activada

O endotélio vascular secreta numerosas proteínas que mantêm o equilíbrio homeostático do vaso. Na infecção ou inflamação este equilíbrio é alterado à medida que o endotélio é activado, resultando na expressão de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão na superfície celular necessárias à adesão e migração dos leucócitos. Estas respostas adaptativas têm um papel crítico, protegendo o endotélio de toxinas, stress oxidativo, hipoxia e várias citocinas. Uma vez perdido o equilíbrio, como acontece na sepsis, a activação do endotélio torna-se desregulada conduzindo ao aumento da actividade pró-inflamatória, procoagulante e de morte celular (9).

A sepsis está associada com um estado procoagulante, que induz activação massiva da coagulação, levando à coagulação intravascular disseminada (DIC) que causa falência multiorgânica (5-8). Alterações nos níveis dos mediadores da coagulação e da fibrinólise têm sido descritos em associação com uma evolução negativa nos doentes com sepsis. Dado o seu papel central nos sistemas da coagulação e fibrinólise, a

PC tem despertado um interesse particular nos distúrbios hemostáticos de doentes com sepsis. Os níveis de PC têm sido descritos como preditivos da evolução e do prognóstico dos doentes com sepsis (26,27).

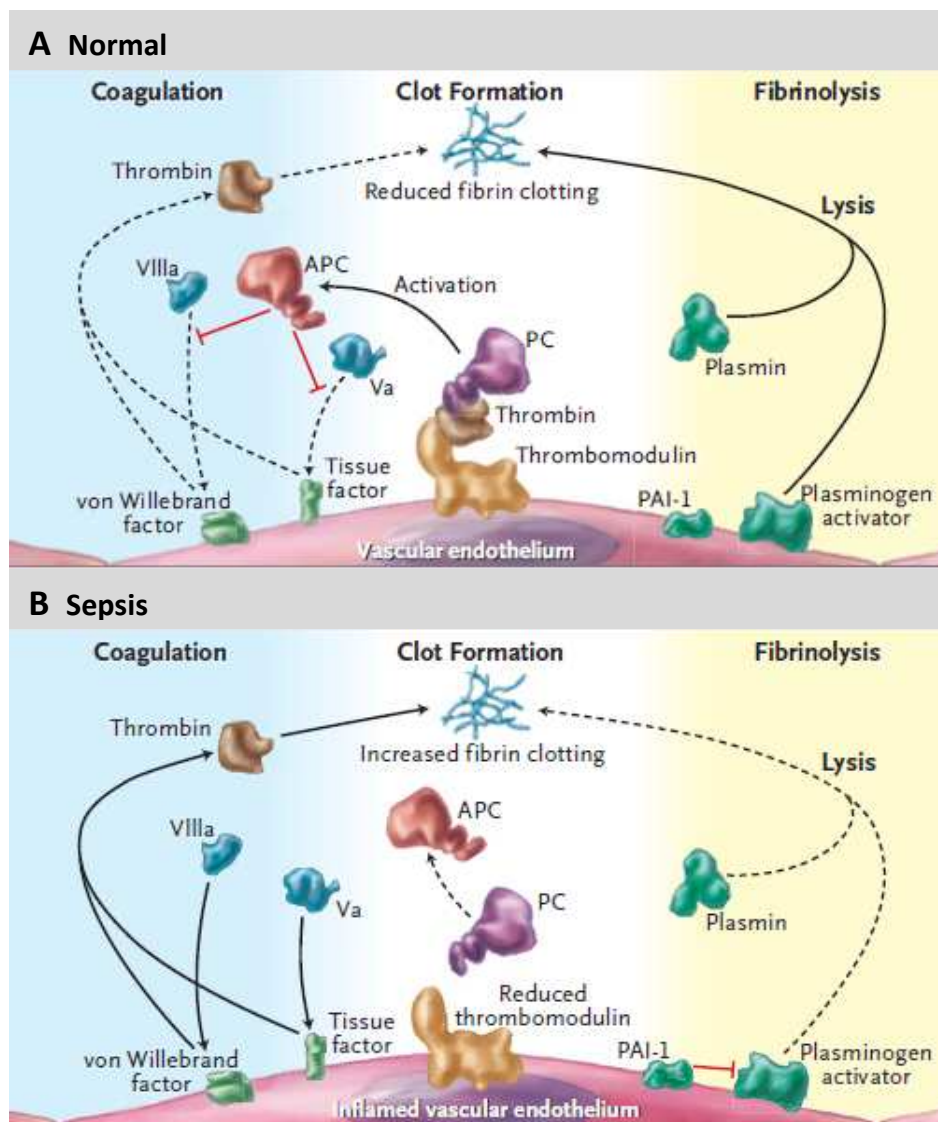


Figura 2 Estado procoagulante nos doentes com sepsis. Numa situação normal (A), a célula do endotélio vascular expressa trombomodulina, que após ligação com a trombina, permite um mecanismo de *feedback* de inibição da formação de trombina por induzir a produção de proteína C ativada (APC) a partir da proteína C solúvel (PC). APC inibe FVa e FVIIIa, cofactores importantes das vias extrínseca e intrínseca da coagulação, respectivamente. Assim, no estado normal, a anticoagulação predomina para manter o fluxo sanguíneo. Além disso, o ativador do plasminogénio, expresso na superfície da célula, inicia a fibrinólise, reduzindo assim a formação do coágulo. A figura B mostra a resposta do hospedeiro à infecção, em que as células endoteliais são activadas por mediadores inflamatórios. A expressão da trombomodulina é marcadamente reduzida, tornando o efeito anticoagulante da APC ineficiente. A fibrinólise é inibida pela expressão do inibidor do activador do plasminogénio 1 (PAI-1) induzida pelas citocinas. Como resultado, o aumento de expressão do factor tecidual e do factor de von Willebrand leva à formação de coágulo e coagulação intravascular disseminada (DIC). Os símbolos T vermelhos indicam a inibição e as setas tracejadas e os símbolos T indicam acções que possam estar presentes na ausência da inibição ou condições mostradas (adaptado de Toussaint and Gerlach, 2010)

Níveis de PC baixos ou muito baixos resultam de aumento de consumo, degradação por enzimas proteolíticas e/ou diminuição da síntese. A activação da proteína também está diminuída pela baixa expressão de TM e EPCR induzida pelas citocinas inflamatórias circulantes. Níveis baixos de PS livre na sepsis, resultantes da formação de complexos com a proteína de fase aguda do sistema complemento - C4bBP, podem comprometer ainda mais o sistema da PC (10,27).

Vários estudos têm relacionado os baixos níveis basais de PC com um maior grau de disfunção orgânica e pior prognóstico na sepsis severa (28-29). A razão para a diminuição da concentração basal de PC tem sido relacionada com 3 polimorfismos de um único nucleótido (SNPs - single nucleotide polymorphisms) na região promotora do gene PROC. Estes 3 SNPs funcionais (-1654C/T, -1641A/G e -1476A/T) têm efeito na transcrição do gene PROC (31) e, consequentemente, nos níveis plasmáticos da PC (32-36). Indivíduos portadores do genótipo CGT em homozigotia têm níveis plasmáticos mais baixos de PC, do que os indivíduos com o genótipo TAA (30,32,36). Contudo, em diversos estudos apenas os polimorfismos -1654C/T e -1641A/G têm sido associados com maior disfunção orgânica e pior prognóstico na sepsis: haplótipos -1654C/-1641A, -1644AA e haplótipo -1654C/-1641G (32-34).

Há, ainda, estudos que afirmam que mais importante do que os níveis basais de PC como factor prognóstico na sepsis, é a capacidade do doente para converter a PC em APC (29). Segundo estes autores, existe uma grande variabilidade na capacidade dos doentes adultos com sepsis gerarem APC em resposta a níveis elevados de trombina, dependendo do defeito individual da via da PC. Alguns indivíduos podem ter apenas níveis baixos de PC, mas outros podem ser incapazes de converter a PC a APC devido aos níveis diminuídos de TM e EPCR, o que pode ter implicações a nível terapêutico. Não se observaram diferenças nos níveis basais de PC entre doentes e controlos, mas os níveis basais de APC em sobreviventes são significativamente mais elevados do que em não-sobreviventes, podendo, portanto, ter valor prognóstico (29).

Antigénio CD64 nos neutrófilos

Os neutrófilos são células efectoras que desempenham um papel crucial durante os processos inflamatórios agudos. Os receptores Fc para as imunoglobulinas G (IgG) - FcγR - são importantes estimuladores da função efectora dos neutrófilos, podendo modular as reacções inflamatórias.

O antigénio CD64 é um receptor de alta afinidade, tipo I, para as regiões Fcγ da cadeia pesada de IgG, podendo ligar monómeros IgG1 e IgG3, assim como agregados

de IgG (43). A fagocitose de bactérias e de outros microorganismos é mediada por este tipo de receptores - Fc γ RI. Durante a fase inicial da granulopoiese, o CD64 é expresso nas células precursoras mielóides, permanecendo até ao estadio de metamielócito. Ao contrário dos monócitos onde o CD64 é constitutivamente expresso, os neutrófilos maduros, não activados, expressam níveis muito baixos de CD64 na sua membrana (37,38).

Nos últimos anos, diversos autores tem focado a sua investigação na utilidade clínica da avaliação da expressão do CD64 nos neutrófilos como um biomarcador de infecção e sepsis. Têm demonstrado que o aumento da expressão do CD64 na superfície dos granulócitos é um indicador sensível e específico de sepsis ou da presença de resposta inflamatória sistémica aguda (39,40).

O marcador HLA-DR, expresso pelos monócitos, foi incorporado neste estudo, porque permite a separação entre os monócitos e granulócitos no processo de “gating” e, em contraste com o CD64, a expressão de HLA-DR nos monócitos está diminuída nos doentes com sepsis.

Expressão de CD64 nos neutrófilos como biomarcador de infecção e sepsis

Diferentes moléculas têm sido propostas como biomarcadores de severidade e/ou de prognóstico na sepsis, incluindo proteínas de fase aguda (proteína C reactiva (CRP) e a procalcitonina (PCT)), marcadores hemostáticos (como PC, d-dímero e fibrinogénio), marcadores da superfície celular (CD64 e HLA-DR) e citocinas pró-inflamatórias. Contudo apenas alguns marcadores demonstraram ter valor preditivo na evolução do estado dos doentes com sepsis.

A expressão de CD64 nos neutrófilos é regulada sob a influência de citocinas inflamatórias como a IL-12, IFN- γ e G-CSF sintetizadas durante as infecções ou a exposição a endotoxinas (39). O CD64 reflecte directamente os acontecimentos fisiológicos da resposta inflamatória à invasão por microorganismos e está funcionalmente correlacionado com a fagocitose. Nos neutrófilos em repouso, não activados, a expressão de CD64 é baixa, cerca de 1000 moléculas por célula. Após activação a expressão de CD64 torna-se rapidamente positiva, cerca de 4-6 horas após o contacto com as citocinas pro-inflamatórias podendo aumentar até 5 a 10 vezes, permitindo uma boa discriminação entre o indivíduo saudável e o doente. Quando o estímulo da activação desaparece, a expressão do CD64 retoma os níveis basais em poucos dias. O CD64 é relativamente estável após a colheita e sua quantificação é simples e requer pouco volume de amostra (40-43).

Diversos estudos têm demonstrado que a quantificação da expressão do CD64 nos neutrófilos é um biomarcador laboratorial mais sensível e específico na detecção de sepsis, ou da presença de SIRS, do que outros marcadores actualmente disponíveis (39-41). Livaditi et al, demonstrou que a quantificação da expressão de CD64, aquando o diagnóstico de sepsis, não só tinha uma sensibilidade e especificidade muito elevadas na detecção de sepsis, como também que se correlacionava fortemente com a severidade e o grau de falência orgânica durante a doença. Doentes em choque séptico geralmente apresentam níveis mais elevados de expressão do CD64 relativamente à sepsis severa e muito mais elevados do que na sepsis e na SIRS (41,44). Expressão elevada de CD64 parece ser um preditor precoce de mortalidade nos doentes com sepsis (44).

Neste estudo propomo-nos avaliar os níveis de PC, fibrinogénio, d-dímeros e plaquetas assim como a expressão do CD64 nos neutrófilos e os níveis séricos de CRP e PCT num grupo de doentes com sepsis.

OBJECTIVOS

Os objectivos principais deste estudo são:

- analisar, nos doentes com sepsis, alterações precoces dos níveis da Proteína C e da expressão do CD64 nos neutrófilos e pesquisar a sua correlação com a severidade e prognóstico da doença;
- estudar os polimorfismos, -1654C/T, -1641A/G e -1476A/T da região promotora do gene *PROC* num grupo controlo e no grupo de doentes com sepsis;
- avaliar a correlação dos polimorfismos com:
 - os níveis de Proteína C, no grupo controlo e no grupo de doentes com sepsis
 - a severidade da sepsis.

Protein C levels and neutrophil CD64 expression as a sepsis biomarkers

Introduction: In the pathophysiology of hemostatic disorders in patients with sepsis, protein C (PC) has attracted particular interest due to its central role in coagulation and fibrinolysis systems. In sepsis a decrease in PC levels is observed has result of increased consumption, degradation and/or decreased synthesis, and low levels in PC have been suggested as predictors of severity and degree of organ dysfunction.

In PC gene promoter region (PROC), there are two functional polymorphisms, -1654C/T and -1641A /G, that had been shown to affect the levels of PC in normal subjects and more recently their role as an aggravating factor in sepsis has been discussed.

Neutrophil CD64 expression has been proposed as an improved laboratory indicator of severe infection and sepsis. CD64 is a membrane high-affinity receptor (FcγRI) found in monocytes and is only expressed at low levels in neutrophils. Upregulation of CD64 expression in neutrophils appears to be a sensitive marker for infection and sepsis.

Objectives: In patients with sepsis, measure early changes in protein C levels and in neutrophil CD64 expression and correlate with severity and clinical outcome. Establish a correlation between three polymorphic sites, -1654C/T, -1641A/G and -1476A/T in the protein C promoter region with plasma protein C levels and sepsis severity.

Material & Methods: In 37 septic patients (sepsis (n = 10), severe sepsis (n = 8), and septic shock (n = 19)) admitted in an Intensive Care Unit (ICU) were determined protein C levels, fibrinogen, d-dimer, procalcitonin and C-protein reactive; neutrophils CD64 expression quantified by flow cytometry and in a CD-Sapphire. Polymorphisms of the promoter region of the gene PROC were evaluated by sequencing. Fifty healthy volunteers acted as control group for determination of protein C levels, quantification of neutrophils CD64 and for genotype analysis of the promoter region PROC. Statistical analysis using Graph Pad Prism version 5.00.

Results: A decrease in plasma PC levels was observed with aggravation of the septic stages (p=0.0018) with lower levels in septic shock group. A statistical significant difference (-16%; p=0.0375) in mean protein C levels was observed between individuals with the TT/AA/AA (116%) and CC/GG/TT (100%) genotypes in control group. There was notable difference in mean protein C levels of septic patients between the group of genotype CC/AA/AA (81%) compared to TT/AA/AA (35.5%; p=0.0359) and CC/GG/TT (30%; p=0.0009) genotypes.

Concerning neutrophils CD64 expression, with both methodologies, we observed an upregulation of CD64 in patients with sepsis compared with healthy controls (with statistical significant difference, p<0.0001); the number of neutrophil CD64 molecules per cell (by flow cytometry) increases with the severity of sepsis, with the highest levels in septic shock.

Conclusions: In this group of patients with sepsis, assessed when admitted to the ICU, the levels of PC and neutrophil CD64 allowed to confirm the diagnosis. PC levels and the number of CD64 molecules/cell were significantly correlated with the severity of sepsis, providing additional information for the reliable assessment of severity of the clinical condition.

This study confirms the link between the -1654C/T and -1641A/G polymorphisms in PC gene promoter and circulating PC levels in control group. Concerning septic patients, although these results are preliminary, and the study is still ongoing, the CC/GG, TT/AA and CT/AG genotypes may be associated with more severe states of sepsis.

INTRODUCTION

Sepsis is a devastating disorder characterized by systemic activation of the inflammatory and coagulation cascades in response to microbial infection (1). Sepsis is defined as a systemic inflammatory response syndrome (SIRS) in the presence of documented or suspected infection. When SIRS is complicated by bacterial infection, it

may progress to more severe forms of the sepsis syndrome, culminating in septic shock with multiple organ failure and even death (2,3).

The inflammation and coagulation pathways co-involved and are intimately linked and there is a remarkable degree of integration in the regulation of these pathways, where thrombosis can activate the innate immune system and inflammation can activate de coagulation pathway. It is now well accepted that inflammation, coagulation and apoptosis occur concomitantly in sepsis and are intimately linked (4-8).

Protein C (PC) is a vitamin K dependent plasma serine protease zymogen that is converted to activated PC on endothelium by the thrombin-thrombomodulin (TM)-endothelial protein C receptor (EPCR) complex (9,11,15,17). In addition to its anticoagulant properties by proteolytic inactivation of coagulation factors Va (FVa) and VIIIa (FVIIIa), activated protein C (APC) has been shown to have anti-inflammatory, cytoprotective and anti-apoptotic activity at the cellular level (11-24).

APC appears to play a central role in the pathogenesis of sepsis and associated organ dysfunction. There is ample evidence that an insufficient functioning of the PC pathway contributes to the derangement of coagulation in sepsis (9,10). In patients with sepsis, this system is malfunctioning at virtually all levels. Plasma levels of the zymogen PC are low or very low because of impaired synthesis, consumption and degradation by proteolytic enzymes. Furthermore, significant downregulation of TM and EPCR, caused by pro-inflammatory cytokines, results in decreased activation of PC. Low levels of free PS may further compromise an adequate function of the PC system (10,27).

Several studies have linked low baseline PC levels with a greater degree of organ dysfunction and poor prognosis in severe sepsis (28-29). The reason for the decreased in PC concentrations in sepsis is multifactorial, in which a genetic role should not be ignored. It has been reported that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes participating in pathophysiologic process of sepsis may contribute to the susceptibility and the outcome of sepsis (30-34). To date, three functional promoter SNPs, -1654C/T, -1641A/G and -1476A/T are located in the 5' untranslated region of PROC gene (30) which have been reported to have an effect on transcription (31) and PC plasma levels (32-36). Subjects carrying the homozygous CGT genotype have lower plasma PC levels than subjects with TAA genotype (30,32). However in several studies only PC -1654C/T and -1641A/G promoter polymorphisms have been associated with more severity organ dysfunction and fatal outcomes in sepsis: PC -1654C/-1641A haplotype, -1644AA and PC -1654C/-1641G haplotype (32-34).

Neutrophil activation is crucial in the pathogenesis of sepsis. There are many reports regarding the measurement of neutrophil membrane CD64 for the diagnosis assessment of infection and sepsis (38,41,43). The membrane molecule defined by monoclonal antibody CD64 is a high-affinity receptor (FcγRI) found on normal monocytes and is only expressed at low levels by normal neutrophils (39,40). Upregulation and increased expression of CD64 on surface of neutrophils appears to be a sensitive and specific marker for systemic infection and sepsis (38,41).

Neutrophil expression of CD64 is upregulated under the influence of inflammatory cytokines such as interleukin 12 (IL-12), interferon gamma (IFN-γ) and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) which are produced during infections or exposure to endotoxin (38). CD64 directly reflects physiologic events of the inflammation response to invading microorganisms and it's functionally correlated with phagocytosis (37,38). In resting neutrophils the level of CD64 expression is rather low, ~1000 molecules/cell. However, following activation it can increase up to 5-10-fold, allowing good discrimination between health and disease becoming positive rapidly, 4-6h following contact with proinflammatory cytokines (43). Further, upregulation of neutrophil CD64 is specific for systemic inflammation, infection and sepsis (41-44).

Several studies have indicated that quantitative neutrophil CD64 expression is a worthwhile candidate for evaluation as a more sensitive and specific laboratory indicator of sepsis or the presence of a systemic acute inflammatory response than available diagnostics (40-44). Furthermore some authors provided evidence that neutrophil CD64, measured at the onset of sepsis, not only had a very high sensitivity and specificity for detecting sepsis syndromes, but also correlated strongly with the severity of sepsis and the degree of organ failure during sepsis. Moreover, high CD64 appeared to be an early predictor of mortality in patients with sepsis (44).

Different molecules have been proposed as severity and/or outcome markers for sepsis, including acute phase proteins (C-reactive protein (CRP) and procalcitonin (PCT)), hemostatic markers (such PC, d-dimer, fibrinogen), membrane cell markers (CD64, HLA-DR) and proinflammatory cytokines. However, only a few markers have showed prediction of outcomes in patients with sepsis. As the neutrophil is the key inflammatory cell responding to sepsis, we measured the expression of the CD64 on the surface of neutrophils, as well as serum CRP and PCT levels in septic patients.

MATERIAL AND METHODS

Patients

Between June and December 2011, 37 consecutive adult patients with sepsis (30 men, 21-80 years; 7 women, 26-80 years) were enrolled into the study, after informed consent was obtained. All patients were admitted in an Intensive Care Unit (ICU) satisfying the staging criteria of the ACCP/SCCM (2) according to which they were allocated as follows: sepsis (n = 10), severe sepsis (n = 8), and septic shock (n = 19). Of the 37 septic patients enrolled in the study, 26 survived, while 11 died. Venous blood was drawn immediately after admission the patient in ICU and processed to measure protein C (PC) activity, D-dimer and fibrinogen levels, platelets count, neutrophil CD64 expression C-reactive protein (CRP) and procalcitonin (PCT).

Fifty healthy volunteers acted as control group for neutrophil CD64 expression, determination of PC promoter genotype and measure of PC activity levels.

Protein C

Protein C activity

PC activity was measured by chromogenic substrate assay on ACL TOP 500 (HemosIL™ Protein C – IL Coagulation Systems), in citrated plasma. This method involves the activation of PC *in vitro* by a protein fraction derived from copperhead snake *Agkistrodon contortrix contortrix* venom, followed by APC quantification with the synthetic chromogenic substrate paranitroaniline. The reaction is monitored kinetically at 405 nm and is directly proportional to the PC level in the test sample. The normal range for PC activity is between 69 – 134%.

Analysis of protein C gene (PROC) promoter region

Genomic DNA PCR analysis

Genomic DNA was extracted from whole blood with the “iPrep™ PureLink™ gDNA Blood Kit” (Invitrogen, Carlsbad, USA). For PC promoter variants studies PCR and direct sequencing were used.

A primer set was designed according to the published sequence of PC gene (GenBank access number AF378903.2) and a 353 bp fragment of the PC gene promoter region (-1726 to -1374 nucleotides) is amplified encompassing the three polymorphic sites: -1654C>T (rs1799808), -1641A>G (rs1799809) and -1476A>T (rs1799810). 5'-CAGCCACTATGGGGCTAAAA-3' (nt.-1726 to -1706) as sense and 5'-

CTCCAGGCAGGTCTATGAGG-3' (nt.-1374 to -1394) as antisense primers, in the numbering system of Foster et al (12).

Genomic DNA PCR amplification was carried out in 25 µL total reaction volume containing 2,5µL 10x PCR buffer (100 mM Tris-HCL, 500 mM KCL, 15 mM MgCl₂) (Invitrogen™); 2µL of dNTP 2,5mM (Invitrogen™); 3,5µL of promoter kit (25µL of forward primer 50 ng/µL, 25µL of reverse primer 50 ng/µL, 10µL of H₂O and 10µL MgCl₂ 50mM); 15,3 µL of H₂O; 0,2 µL of *Platinum®* Taq DNA Polymerase 5U (Invitrogen™); and 1,5µL of genomic DNA.

PCR reaction was performed in a Biometra TPersonal Thermocycler (Biometra GmbH, Germany). Amplification conditions were as follows: denaturation at 94°C for 3 min, followed by 34 cycles of denaturation at 94°C for 20 s, annealing at 59°C for 30 s, and extension at 72°C for 1 min, an additional extension cycle at 72°C for 5 min and a final step of pause at 22°C. Amplification of the 353 bp fragment was confirmed by electrophoresis in 2% agarose gel.

Direct sequencing

PCR products were purified with ExoSAP-IT® (USB, Cleveland, OH, USA); DNA sequencing was performed directly mixing 2,8 µL of purified PCR product with 1µL BigDye Cycle Sequencing v1.1® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and 0,5µL of direct sequencing primer 50 ng/µL for further reaction. The cycling program was denaturation at 94°C for 3 min followed by 25 cycles of 96°C for 10 s, annealing at 50°C for 5 s, 60°C for 3min. The product was purified with DyeEx 2.0 Spin Kit ((QIAGEN, Hilden, Germany), then loaded onto an ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The chromatograms were generated on the basis of sequencing data obtained with the Applied Biosystems model ABI Prism 3130 DNA sequencing instrument and analyzed using SeqScape® v2.6 (Applied Biosystems). Polymorphisms were identified by comparison of the sequencing results of all samples against the GenBank sequence referenced above. Polymorphisms were previously reported in Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff (HGMD; <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>).

Fibrinogen, D-dimer assays and Platelet counts

Fibrinogen was measured by the Clauss method, in human citrated plasma on IL Hemostasis systems (HemosIL™ Protein C – IL Coagulation Systems). Fibrinogen levels below 156mg/dL were considered abnormal.

D-dimer was measured in citrated plasma by quantitative turbidimetric latex assay on the automated coagulometers from IL (HemosIL™ Protein C – IL Coagulation Systems). A cut-off at 230 ng/mL for HemosIL D-Dimer was used to define positive samples.

Platelet (PLT) counts were performed on CELL-DYN® Sapphire hematology analyzer using optical methodology. The normal range for PLT counts is between 150 – 400 x10³/μL.

CD64 expression assay

Flow cytometry

Neutrophils CD64 expression was quantified by flow cytometry using a FACSCalibur (BDBiosciences, San Jose, CA). Whole blood (100μL) was stained with anti-CD64-PE (IgG1 subclass; Beckman Coulter) and anti-HLA-DR-FITC (IgG1 subclass; Beckman Coulter), and incubated in a polypropylene tube, 10 min in the dark, at room temperature. Red blood cells were lysed with FACS lysing solution (BDBiosciences, San Jose, CA) for 10 min and samples were centrifuged, washed and resuspended in 2 mL PBS before acquisition. Fifty thousand events were acquired for each sample. Polymorphonuclear cells (PMNs) were distinguished by their characteristic side and forward scatter (SSCa/FSCa) profile and CD64 expression was evaluated by the mean fluorescence intensity (MFI). Results were expressed as MFI of the anti-CD64-labeled cells, representing the mean level of fluorochrome antibody binding sites/cell. CellQuest software (BDBiosciences, San Jose, CA) was used for fluorescence quantitative analysis. To circumvent the day to day variations in MFI values, we converted MFI values to molecules of equivalent soluble fluorochrome (MESF) units using standardized fluorescent beads (Quantum™ PE Medium Level, BangsLabs, USA). Data are provided as molecules/cell.

CELL-DYNN Sapphire

The CELL DYNN Sapphire (CD-Sapphire) mode for determination of T-cells subsets was adapted for the immunological determination of CD64 antigen expression on neutrophils surface. The two reactions vials normally used for the CD3/4/8 counts (CD3/CD4 and CD3/CD8) were replaced by bar-coded tubes containing 100μL of EDTA-anticoagulated whole blood plus 5μL each of CD64/PE and HLA-DR/FITC monoclonal antibody reagents. Automated CD-Sapphire processing was started following incubation of the blood /antibody mixtures at room temperature for approximately 2 minutes. No

sample washing was required, and red cell lysis was incorporated by the analyser in the automated procedure. On completion of instrument blood sampling and data acquisition, raw data files were downloaded to a PC and batch-converted to standard FCS 3.0 format with Cell-Dyn Clinical Data Standards converter software (CDS Office Suite; Abbott Diagnostics Cell-Dyn R&D Department Europe) prior to population analysis (FCS Express v3 DeNovo Software).

Procalcitonin and C-reactive protein assays

Procalcitonin (PCT) was measured by a homogeneous immunoassay (sandwich principle) (PCT sensitive, Brahms-Diagnostica, Berlin, Germany) in plasma. Detection threshold was 0.1 ng/mL; PCT levels >0.5 ng/mL were considered abnormal.

C-reactive protein (CRP) was measured by sandwich immunoassay for quantitative measure in serum or plasma on VITROS® Chemistry Systems (Ortho-Clinical Diagnostics, Buckinghamshire, UK) CRP levels >0.5 mg/dL were considered abnormal.

Statistical analysis

Data are reported as median and interquartile range (25th – 75th percentiles). PC levels and expression of CD64 on neutrophils were expressed as medians with quartiles and ranges. Kruskal-Wallis one-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare differences between the normal, sepsis, severe sepsis and septic shock groups of patients. Pairwise comparisons were made by Mann–Whitney U-test. Pearson's correlation coefficient was used to determine the relationship between the hemostatic biomarkers, CD64 expression on neutrophils and PCT and CRP as indicators of infection. Frequencies of the C/T, A/G and A/T polymorphism alleles were calculated by gene counting. Distribution of haplotypes between the studied groups was analyzed using Fisher's exact test. The Bonferroni method was used to correct for multiple comparisons where applicable. Coefficient correlation was obtained using simple regression analysis. Student's test (unpaired) was used to compare means. Receiver-operating characteristic (ROC) curves were drawn to define the optimal sensitivity, specificity, cutoff value, and diagnostic accuracy, determined by the area under the ROC curve (AUC) of neutrophil CD64 expression. The cutoff values at which the greatest sum of sensitivity and specificity was obtained were determined by the statistical program. Data were analyzed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows statistical software (GraphPad, San Diego, CA). Statistical significance was assumed at P value less than 0.05.

RESULTS

Protein C levels in sepsis, severe sepsis and septic shock

Table 1 provides comparative data on protein C (PC) activity, fibrinogen and D-dimers levels and platelets counts in the 3 groups of patients: sepsis, severe sepsis and septic shock. PC activity on day one of admission in the Intensive Care Unit (ICU) was below the lower limit of normal in 26 of the 37 septic patients (70%). A statistically significant decrease in mean of PC activity was found between each of the septic groups (sepsis (74%), severe sepsis (59%) and septic shock (38%)) and healthy controls (107%) ($p < 0.0001$).

Boxplot showing the relationship between PC activity levels in the different septic stages are displayed in Graphic 1. A decrease in plasma PC levels was observed in the course of aggravation of the septic stages, with statistically significant differences between the 3 different stages ($p = 0.0018$ by the Kruskal-Wallis test). PC activity levels were significantly lower in patients with septic shock compared to the other groups, and most of the non-survivor patients (8/11) had the lowest levels (Graphic 2).

Fibrinogen, D-Dimer, and platelet count correlation with sepsis severity

In 2 of the 37 patients (5%) fibrinogen levels were below the lower limit of normal, < 156 mg/dL; these patients were in shock. Statistical significance was found between the stages of sepsis and severe sepsis and the septic shock ($p = 0.0024$); the presence of shock was associated with the lower baseline fibrinogen levels (Table 1).

In all patients D-dimer levels were above the upper cut-off level (< 232 ng/mL) and no statistical significance was found between the different stages of sepsis ($p = \text{ns}$).

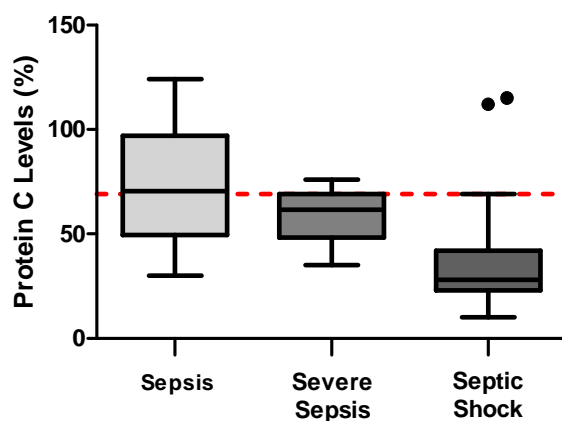
Sixteen of the 37 patients (43%) had platelet counts below the lower limit of normal, $150 \times 10^3/\mu\text{L}$. Although platelets counts had no statistical difference when correlated with the severity of sepsis, we observed a tendency for lower levels in the septic shock group.

Table 1 Coagulation markers: PC, Fibrinogen, D-Dimer and Platelets Count in Sepsis, Severe Sepsis and Septic Shock

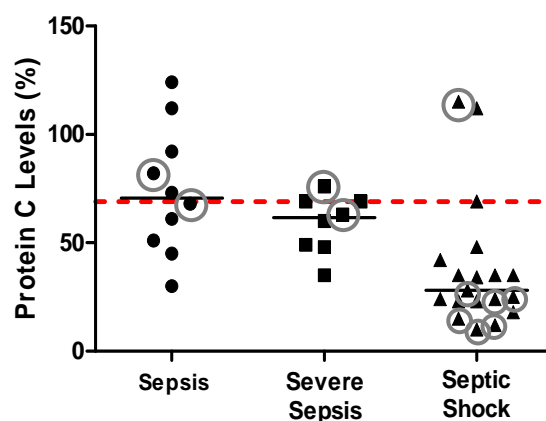
	Sepsis (n=10)	Severe Sepsis (n=8)	Septic shock (n=19)	P value**	Reference values
	Median (IQR)*	Median (IQR)	Median (IQR)		
Protein C activity (%)	70,5 (49,5 – 97,0)	61,5 (48,2 – 69,0)	28,0 (23,0 – 42,0)	0,0018	69-143%
Fibrinogen (mg/dL)	431,0 (369,5 – 656,5)	428,0 (325,5 – 686,8)	303,0 (213,5 – 364,5)	0,0024	156-400 mg/dL
D-Dimer ng/mL	1073,5 (488,8 – 2554,2)	1932,5 (1239,0 – 3263,2)	1964,0 (735,0 – 5350,0)	0,3033	<232ng/mL
Platelets x10 ³	169,5 (110,8 – 378,8)	269,5 (241,2 – 371,5)	141,0 (57,0 – 268,0)	0,0725	150-400 x10 ³ /μL

*IQR _ interquartile range (25th percentile to 75th percentile of distribution).

** The p-values for overall group differences tested using Kruskal-Wallis one-way analysis of variance (ANOVA).



Graphic 1 Boxplot summary of PC plasma levels in septic patients (Sepsis, Severe Sepsis and Septic Shock). The dashed red line shows the PC activity lower limit of normal range in our laboratory for. The line in the box indicates the median value. Box encompasses 25th to 75th percentile, while the whiskers indicate the minimum and maximum values. Outliers are shown as dots.



Graphic 2 Scatter dot plot summary the distribution of PC plasma levels in septic patients (Sepsis, Severe Sepsis and Septic Shock). The dashed line shows our laboratory lower limit of normal range for PC activity. The line indicates the median value. The dots within the grey circles correspond to patients non-survivors.

Distribution of PROC -1654C/T, -1641A/G and -1476 A/T polymorphisms in controls and patient groups

The three different genotypes for each of the PROC polymorphisms and the C/T, A/G and A/T allele frequencies in the controls and different septic groups are shown in table 2. The allele frequencies analysis showed that most of the alleles contain the C nucleotide (-1654C/T) in all septic groups (sepsis, severe sepsis and septic shock) with frequencies of 0.60, 0.75 and 0.53, respectively. Concerning A/G polymorphism, the A nucleotide is also the most frequent in all groups (frequencies of 0.55, 0.69 and 0.55, respectively). With respect to the A/T polymorphism, the A nucleotide is more abundant in sepsis (0.70), severe sepsis (0.75) and in septic shock (0.68). In the three polymorphisms, the allelic frequency differences between septic groups and controls are not statistically significant.

Table 2 PROC polymorphisms -1654C/T, -1641A/G and -1476A/T and the allelic frequencies in controls and septic groups (n = number of individuals).

Polymorphism	Controls (n=50)	Sepsis (n= 10)	Severe sepsis (n=8)	Septic shock (n=19)
-1654 C>T				
CC	21	4	4	4
CT	21	4	4	12
TT	8	2	0	3
C allele	0.63	0.6	0.75	0.53
T allele	0.37	0.4	0.25	0.47
-1641 A>G				
AA	20	3	4	6
AG	20	5	3	9
GG	10	2	1	4
A allele	0.60	0.55	0.69	0.55
G allele	0.40	0.45	0.31	0.45
-1476A>T				
AA	21	5	4	9
AT	20	4	4	8
TT	9	1	0	2
A allele	0.62	0.7	0.75	0.68
T allele	0.38	0.3	0.25	0.32

The haplotypes distribution of frequencies in control and patient groups is shown on Table 3. CAA haplotype is the most abundant in both groups (frequencies of 0.64 and 0.70, respectively). TAA haplotype has the 2nd higher frequency, 0.56 and 0.59, respectively. The distribution of 8 different haplotypes among controls and patients groups

was not significantly different, even after Bonferroni correction for multiple comparisons ($p > 0.05$). However, the distribution of TAA haplotype was significantly different among the groups of severe sepsis (0.38) and septic shock (0.74).

Table 3 Distribution of PROC haplotypes -1654C/T, -1641A/G and -1476A/T frequencies among controls and the three septic patients groups;

Haplotype -1654 /-1641 /-1476	Controls (n=50) no. (%)	All patients, (n=37) no. (%)	Sepsis (n=10), no. (%)	Severe Sepsis (n=8), no. (%)	Septic shock (n=19), no. (%)
CAA	32 (0.64)	26 (0.70)	7 (0.70)	7 (0.88)	12 (0.63)
CGA	21 (0.42)	20 (0.54)	5 (0.50)	4 (0.50)	11 (0.58)
TAA	28 (0.56)	22 (0.59)	5 (0.50)	3 (0.38)*	14 (0.74)*
TGA	14 (0.28)	14 (0.38)	4 (0.40)	1 (0.13)	9 (0.47)
CAT	20 (0.40)	14 (0.38)	4 (0.40)	3 (0.38)	7 (0.37)
CGT	20 (0.40)	19 (0.51)	5 (0.50)	4 (0.50)	10 (0.53)
TAT	13 (0.26)	8 (0.21)	2 (0.20)	0	6 (0.32)
TGT	13 (0.26)	9 (0.24)	2 (0.20)	1 (0.13)	6 (0.32)

* $p < 0.05$ for severe sepsis versus septic shock patients with haplotype TAA;

Table 4 summarizes the of PC activity mean levels in controls and patients with 11 possible PROC genotypes (-1654 /-1641 /-1476). Four genotypes observed in patients were not found among controls (CT/AG/AA, CT/GG/AT, TT/GG/AA and CC/GG/AT). The overall mean PC activity in the control group was 107% (n=50), whereas septic patients group (n=37) had a mean level of 53%. Concerning PC activity levels in controls: homozygous CGT (CC/GG/TT) had a mean of 100% (n=9); complete heterozygotes (CT/AG/AT) had a mean of 105% (n=13), while homozygous TAA (TT/AA/AA) had a mean of 116% (n=8). These results indicate a 16% higher PC activity mean level in TT/AA/AA in comparison with CC/GG/TT individuals, which is statistically significant ($p=0.0375$). As Table 4 shows, a notable difference was found in protein C mean levels between patients and control subjects in all groups of genotypes. Patients heterozygous CT/AG/AT had a PC mean level of 42% (n=8), while the 4 patients homozygous TT/AA/AA and 3 patient homozygous CC/GG/TT had a PC mean level of 35.5% and 30% respectively; however, no significant differences were found between these 3 groups. Individuals with one of the remaining genotypes had mean PC levels similar or slightly higher (CT/AA/AA, CT/AG/AA, CT/GG/AT and CC/GG/AT) or within the normal range (CC/AA/AA, CC/AG/AT, CT/GG/AA and TT/GG/AA).

Patients with the CC/GG/TT and TT/AA/AA have a marked decrease in PC mean levels comparing to the other groups, with a significant difference between CC/AA/AA and CC/GG/TT ($p=0.0009$) and CC/AA/AA and TT/AA/AA genotypes ($p=0.0350$). In addition, patients carrying genotypes CT/AG/AT, CC/GG/TT and TT/AA/AA, with the lower levels of PC, are mostly patients with septic shock; which suggest that septic patients carrying these PC genotypes experienced higher disease severity than others. Among the eleven patients who died, 4 patients (36%) had CT/AG/AT genotype, and besides, were patients with septic shock. The remaining patients had distinct genotypes with different severity of disease.

Table 4 Mean PC activity levels in patients (n=37) and controls (n=50) with the 11 different PROC genotypes (-1654 /-1641 /-1476)

Genotype -1654 /-1641 /-1476	Controls (n=50)	Mean PC activity (%) in controls	Sepsis (n=10)	Severe sepsis (n=8)	Septic shock (n=19)	Mean PC activity (%) in patients
CC/AA/AA	5	103	1	1	0	81*
CT/AA/AA	7	110	1	3	3	65
CT/AG/AA	0	-	1	0	2	40
CC/AG/AT	7	109	2	3	1	68,5
CT/AG/AT	13	105	2	0	6	42
CC/GG/TT	9	100	1	0	2	30*
CT/GG/AA	1	142	0	0	1	69
CT/GG/AT	0	-	0	1	0	48
TT/AA/AA	8	116	1	0	3	35,5*
TT/GG/AA	0	-	1	0	0	92
CC/GG/AT	0	-	0	0	1	48

* $p < 0.05$

The analysis of genotype distribution of the -1654 C/T and -1641 A/G polymorphisms in the overall group (controls and patients) are presented in table 5. The genotype distribution does not differ significantly from the analysis of three polymorphisms simultaneous. PC mean levels of controls were similar for each of these genotypes, with statistically significance difference in PC levels between individuals with CC/GG and TT/AA genotypes ($p=0.0375$). Concerning patients' group, the lowest PC mean levels were observed in patients with CT/AG, CC/GG and TT/AA genotypes, as observed above in analysis of three polymorphisms, and are mostly patients with septic shock, which suggest that septic patients carrying these PC genotypes experienced a most severe disease than others.

Table 5 Mean PC Activity Levels in controls and patients with 8 different genotype combination (-1654 /-1641)

Genotype -1654 /-1641	Controls	Mean PC activity (%) in controls	Sepsis	Severe sepsis	Septic shock	Mean PC activity (%) in patients
CC/AA	5	103	1	1	0	81
CT/AA	7	111	1	3	3	65
CT/AG	13	104	3	0	8	41
CC/AG	7	108	2	3	1	69
CC/GG	9	100	1	0	3	35
CT/GG	1	142	0	1	1	59
TT/AA	8	116	1	0	3	36
TT/GG	0	-	1	0	0	92

Neutrophil CD64 expression

By Flow cytometry

The number of neutrophil CD64 molecules per cell in normal controls and sepsis, severe sepsis and septic shock patients are shown in Graphic 3A and Table 6.

In normal controls neutrophil CD64 expression has an interquartile range (IQR) of 534.9 – 1425.1 molecules/cell and is statistically significantly lower comparing to septic patients ($p<0.0001$). Pair-wise comparisons (Mann-Whitney test) of CD64 expression between the different septic stages and the control group showed significant differences ($p<0.0001$). A progressively increase in CD64 expression was observed regarding the severity of sepsis. The median CD64 expression (molecules/cell) was 13406.3 (IQR 6857.8 – 20250.1) in sepsis, 19940.3 (14294.1 – 26773.2) in severe sepsis, and 23113.9 (12093.8 – 42485.0) in septic shock, however, no significant differences were found between the different stages of sepsis ($p>0.05$ by the Kruskal-Wallis test).

Table 7 shows the optimum diagnostic cut-off levels, AUC, sensitivity and specificity of CD64 molecules per neutrophils in suspected septic patients. By ROC curve analysis, the optimal CD64 expression cut-off value for predicting sepsis was >2172 molecules per cell, with a sensitivity of 95% and a specificity of 97%. This cut-off level is the same for all stages of sepsis.

The AUC for CD64 expression was 0.98 (95% CI 0.95 – 1.01; $p<0.0001$). The positive and negative predictive values were 97% and 95%, respectively.

By Cell Dynn Sapphire

Semi-quantitative determination of neutrophil membrane CD64 expression obtained with the CD-Sapphire was expressed as Arbitrary Fluorescent Units (AFU).

Consistently with data obtained by conventional flow cytometry methodology, the expression of CD64 by neutrophils was higher in septic patients than in controls, with no significant differences between the different stages of sepsis ($p>0.05$ by the Kruskal-Wallis test); CD64 expression in the control group differs significantly from all septic groups ($p<0.0001$ Mann-Whitney U test). However, the progressive CD64 expression increase from the control group to the septic shock group (observed in the quantification of molecules per cell by conventional flow cytometry) was not replicated by this methodology (Graphic 3B and Table 6).

When a CD64 level cut-off of 45.32 AFU was used, the sensitivity of the assay to differentiate sepsis from non-sepsis was 60% with a specificity of 97%. The AUC for CD64 expression was 0.78 (95% CI 0.67- 0.90, $p<0.0001$). The positive and negative predictive values were 100 % and 60%, respectively (Table 7).

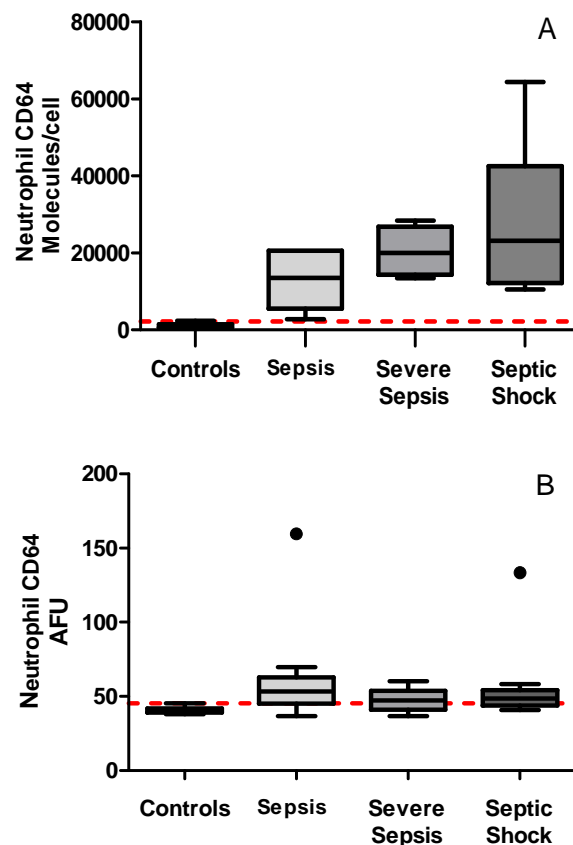
Table 6 Neutrophil CD64 expression (molecules per cell and Arbitrary Fluorescent Units (AFU)) in group of controls and septic patients (Sepsis, Severe Sepsis and Septic Shock)
Data are expressed as median and interquartile range (25th – 75th percentiles in parentheses)

	No. of patients	Neutrophil CD64 Expression	
		Molecules/cell	AFU
Controls	50	839,9 (534,9 – 1425,1)	40,7 (39,1 – 41,9)
Sepsis	10	13406,3 (6857,8 – 20250,1)	48,7 (39,2 – 56,2)
Severe Sepsis	8	19940,3 (14294,1 – 26773,2)	47,2 (41,0 – 53,7)
Septic shock	19	23113,9 (12093,8 – 42485,0)	47,1 (43,7 – 52,8)

Table 7 Optimum diagnostic cutoff level, diagnostic accuracy with 95% confidence interval (CI) determined by the area under the ROC curve (AUC), sensitivity, and specificity for given cutoff levels of CD64 molecules per cell and AFU at the time of suspected sepsis or infection.

*Area under curve (AUC), Positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV)

	Cutoff level	AUC (95% CI)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
Neutrophil CD64 Molecules/cell	>2172	0,98	95	97	97	95
Neutrophil CD64 AFU	>45,32	0,78	60	97	100	60

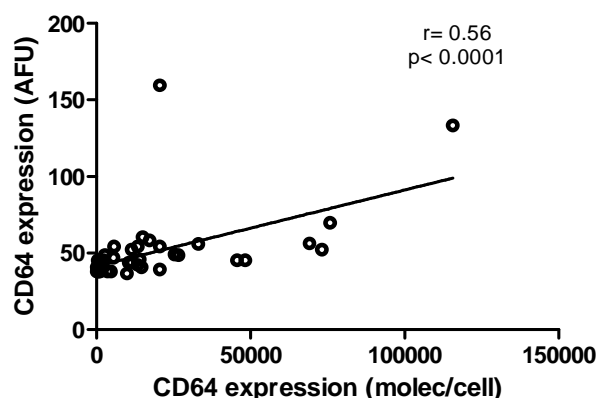


Graphic 3 A box plot of the CD64 results for controls and three patient groups: sepsis, severe sepsis and septic shock. The dashed line shows our laboratory cut off point for abnormal at 2172 CD64 molecules per neutrophil (A) and 45.32 AFU (B). The line in the box indicates the median value. The box shows the 25th–75th centiles, while the whiskers indicate the minimum and maximum values. Outliers are shown as dots. The control group is significantly different from all the others by the Mann-Whitney U test ($p < 0.01$) for both measurements.

Association between number of CD64 molecules per cell and Arbitrary fluorescent units

Correlation between the two methods for CD64 expression quantification used in this study: number of molecules per cell by flow cytometry and AFU by CD Sapphire, was assessed by parallel analysis of all samples, patients and controls.

Significant positive correlation was found between the number of molecules per cell and AFU, with correlation coefficient, r , of 0.56 and p value < 0.0001 , (Graphic 4).

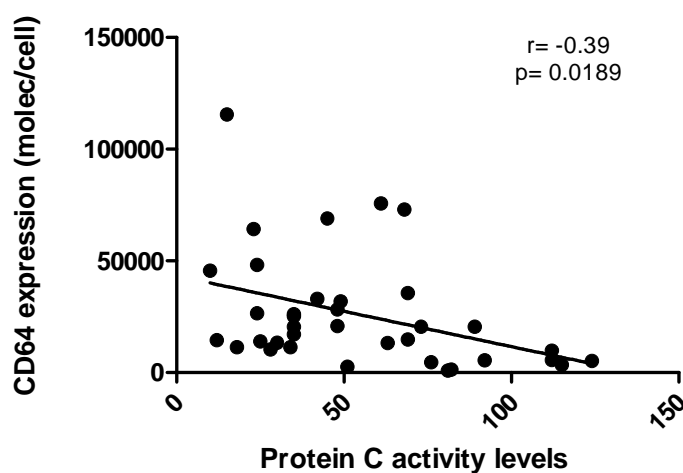


Graphic 4 Relationship between CD64 expression molecules per cell and CD64 expression AFU in controls and septic patients.

Association between coagulation markers and CD64 expression with protein C levels

The correlation between the coagulation markers (fibrinogen, D-dimer and platelets), and the CD64 expression (molecules/cell) with PC levels was weak or non-existent. At baseline, there was also a weak correlation between plasma PC levels and fibrinogen concentration ($r=0.53$, $p=0.0007$) and PC levels and platelet count ($r=0.37$, $p=0.0237$). There was a modest inverse correlation between the plasma PC level and the D-Dimer levels ($r = -0.48$, $P = 0.0024$).

Significant inverse correlation was found between PC activity levels and CD64 expression molecules per cell ($r = -0.39$, $p=0.0189$) (Graphic 5).



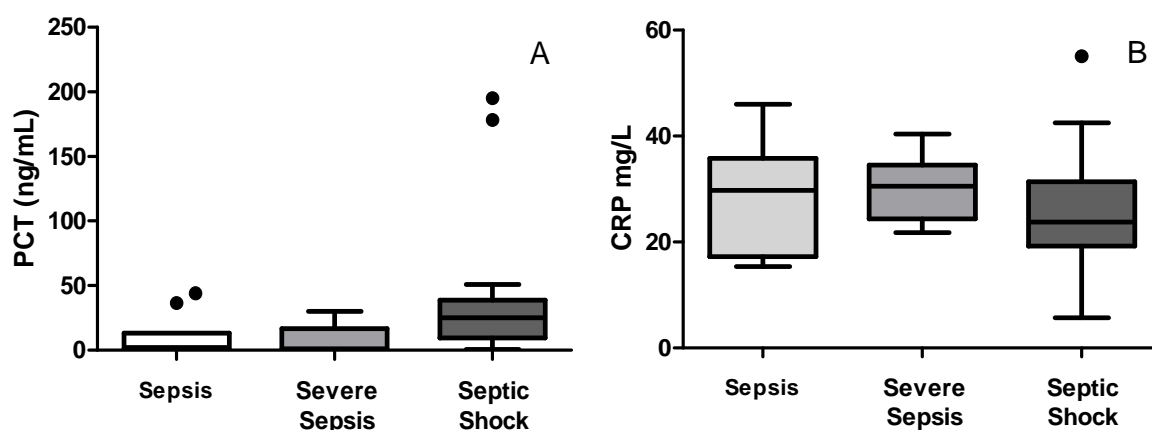
Graphic 5 Relationship between CD64 expression molecules per cell and protein C activity levels in septic patients.

Procalcitonin and C-protein reactive levels correlation with sepsis severity

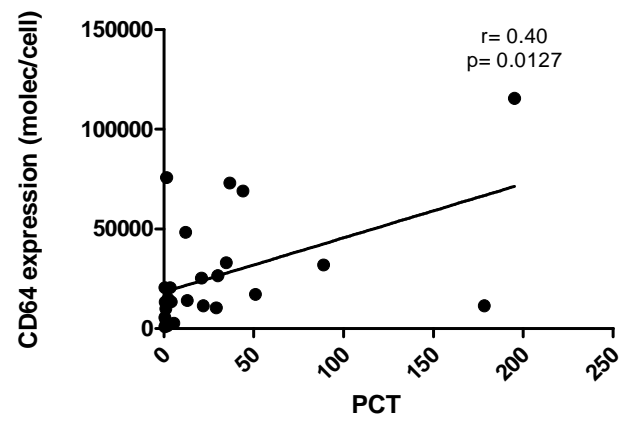
Procalcitonin (PCT) increased from 1.90 (0.48 – 13.25) in sepsis to 2.51 (0.57 – 9.74) in severe sepsis and 25.16 (10.63 – 38.23) ng/mL in septic shock (Graphic 6A). Significant differences in PCT were found between sepsis and septic shock groups ($p = 0.0228$) but not between sepsis and severe sepsis ($p = \text{ns}$).

The C-reactive protein (CRP) levels varied from 29.8 (16.08 – 33.90) in sepsis to 30.85 (22.78 – 36.72) in severe sepsis and 23.9 (19.4 – 31.4) mg/L in septic shock (Graphic 6B). No significant differences in CRP were found in the different stages of sepsis ($p = \text{ns}$).

Significant positive correlation was found between PCT levels and the number of CD64 molecules per cell ($r=0.49$, $p=0.0127$) (Graphic 7); however, the association between CRP levels with the number of CD64 molecules per cell was non-existent ($p=\text{ns}$).



Graphic 6 PCT (A) and CRP (B) levels in septic patients (<24 h from clinical onset): Sepsis (n=10), Severe Sepsis (n=8) and Septic Shock (n=19). Significant differences in PCT were found between sepsis and septic shock groups ($p = 0.0228$), but not between sepsis and severe sepsis groups ($p = \text{ns}$). No significant differences in CRP were found between all sepsis groups ($p=\text{ns}$), (Kruskal-Wallis test, followed by Mann-Whitney test). Line within box: median; edges of box: quartiles (Q1, Q3); whiskers: range of values; dots: outliers value.



Graphic 7 Relationship between CD64 expression molecules per cell and PCT levels in septic patients.

DISCUSSION

Activated protein C (APC) is a serine protease that inhibits coagulation factors Va (FVa) and VIIIa (FVIIIa), with the consequent blocking of thrombin generation. APC also exhibits profibrinolytic activity neutralizing plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) or limiting the activation of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) by limiting thrombin generation. Protein C (PC) circulates mainly in the zymogen form in plasma and is activated via the complex of thrombin with the endothelial cell surface protein thrombomodulin. In large blood vessels, the activation of PC is facilitated by the endothelial protein C receptor (EPCR) which complexes with thrombin-thrombomodulin (TM) (9,11,15).

APC appears to play a central role in the pathogenesis of sepsis and associated organ dysfunction (9,10). There is ample evidence that insufficient functioning of the PC pathway contributes to the derangement of coagulation in sepsis (10,19). PC levels were reported to be below the lower limit of normal in more than 80% of patients with severe sepsis (28,45-46). Several studies demonstrated a decrease in PC levels in correlation with severity of the disease, indicating a poor prognosis. Low PC levels in septic patients have also been associated with multi-organ dysfunction and often develop before the onset of the clinical parameters that are used to define severe sepsis or septic shock and therefore could be considered a prognostic indicator (9, 28, 46-51).

In our study, 26 out of 37 patients (70%) had PC levels at baseline below the lower limit of normal, which suggests an acquired PC deficiency. Among these, 21 out of 26 patients had severe sepsis or septic shock; only 6 patients, with a severe disease, had normal PC levels. Our data, summarized in Graphic 1 box-plots, clearly show that PC activity levels decrease with deteriorating septic stages, corroborating the observations reported by other authors (47-50). The reason for the early decrease in PC concentrations is probably multifactorial. Acute inflammation, as a response to severe infection or trauma, results in systemic activation of the coagulation system. Cytokines have been shown to play an important mediatory role through activation of the tissue factor (TF)-factor VIIa (extrinsic) pathway. Vascular endothelial cells also play a central role in mechanisms contributing to inflammation-induced activation of the coagulation system (4-6). Therefore, the subsequent consumption of anticoagulant factors, including PC, is one of the possible reasons for the decrease in PC levels seen in patients with severe sepsis. Liver dysfunction with the consequent impairment of hepatic protein synthesis may also be a contributing factor (10,27,29).

The PC pathway appears to be especially sensitive to downregulation by inflammatory mediators (7): endotoxin and inflammatory cytokines all downregulate both TM and EPCR, thereby reducing the ability to generate APC (7,29). Liaw et al. showed that adult patients with severe sepsis vary markedly in their ability to generate APC in response to elevated thrombin levels, depending on individual defects in the PC pathway. Some patients may have low levels of PC, whereas others may have impaired PC activation due to decreased levels of TM and EPCR on the vascular endothelium (29). Recently, several authors showed that a specific haplotype of EPCR gene – haplotype 3 – is associated with high levels of soluble form of EPCR (sEPCR), and with high plasma levels of PC (51-54). A soluble form of this receptor circulates in plasma and inhibits both PC activation and APC anticoagulant activity (54-57). One limitation of our study is that we did not evaluate the ability of PC activation by reduced levels of expression of TM and EPCR; furthermore, the study of genes that may be determinants of variations in PC levels, can be performed, as the study of haplotype 3 of EPCR gene.

In addition to the PC levels, we analyzed three other hemostatic markers (D-fibrinogen, dimer and platelets) on day one of admission in our Intensive Care Unit (UCI).

Thirty-five of 37 patients had fibrinogen levels in or above the normal range. A statistically significant difference was found between the septic shock group and others stages of sepsis, with the lower levels in the septic shock.

Fibrinogen is an acute-phase reactant, it is expected to find higher levels in severe infections, however, it is going to be consumed during the coagulopathy phase of shock (7,59).

Thrombocytopenia has found in 16 patients. The mechanism by which thrombocytopenia in sepsis occurs, can be multifactorial: impaired of synthesis, consumption, immune or induced by heparin (52).

The D-dimer levels were above the upper limit in all patients, however, no significant difference was observed between patients groups.

Other aim of this study was also investigate the influence of three polymorphic sites in promoter region of the PROC gene on plasma levels of PC in correlation with disease severity. Was also evaluated the frequency of genotypes in septic patients compared with control group.

Previous studies demonstrated that the transcriptional efficiency of the PC gene was driven by three functional promoter polymorphisms -1654C/T, -1641A/G and -1476A/T which regulate the PC levels (31,36,63). Although, only -1654C/T and -1641A/G

have been associated with more severity organ dysfunction and fatal outcomes in sepsis, in the present study were included three polymorphisms.

Spek et al., Aiach et al. and Binder et al, showed that -1654C/-1641G/-1476T haplotype, the most frequent haplotype in western Europeans populations, was associated with lower plasma PC levels and was a risk factor for deep-vein thrombosis, pulmonary embolism and meningococcal sepsis (32,36,55). On the other hand, the same authors showed that the TAA haplotype increased the PC concentration when in homozygotes that conferred a protective role for development of meningococcal sepsis. Recently, Pomp et al. showed that CC/GG genotype is associated with lower PC levels compared with individual carrying TT/AA genotype (56). Our data are consistently with these findings: in control group, the mean PC activity level of individuals with the homozygous CGT genotype is about 16% less than that of individuals with the homozygous TAA genotype. In concerning patients' group the differences were less marked, patients with CC/GG/TT genotype, one with sepsis and 2 with septic shock, PC levels were about 30%; in homozygous TAA septic patients, the mean levels of PC are 35,5%, while patients with CT/AG/AA genotype had 40%. Eight patients (2 with sepsis and 6 with shock) complete heterozygotes CT/AG/AT had similar mean levels of PC (42%). The analysis of genotype distribution only PC -1654C/T and -1641 A/G promoter polymorphisms, which have been suggested to have functional effects (36,63), is similar to the analysis of three polymorphisms simultaneously, both the levels of PC of each genotype as on their distribution in septic groups, suggesting that the -1476 A/T polymorphism has little influence.

Since these results are preliminary, due to the reduced number of patients, and considering this study is ongoing, we can only suggest tendency of the results, in concerning the analysis of genotypes distributions; the CC/GG, TT/AA and CT/AG genotypes seem to be associated with more severe states of sepsis.

In a recent report Walley and Russell examined the A-1641G polymorphism, completely confined to the -1654C/-1641A haplotype, in a sepsis patient cohort (n=62) (33). In patients having severe sepsis they found an association between -1641AA genotype and decreased survival, high organ dysfunction and increased systemic inflammation response. Chen and coworkers (34) found that the CA haplotype of PC -1654C/T and -1641A/G was associated with more severity of organ dysfunction and fatal outcomes in Chinese Han patients with severe sepsis, but neither -1654C/T variation nor -1641A/G polymorphism alone contributes to the susceptibility and outcome to severe sepsis. Our study showed that the prevalence of the -1641AA genotype among the septic

groups no differs significantly, and the distribution of CA haplotype occurs with higher frequency in all groups of patients but with no statistically significant difference, not associated with disease severity.

Expression of the CD64 antigen on neutrophils has been under investigation for several years as a biomarker of infection and sepsis. Its characteristics make it suitable for clinical application: on resting neutrophils CD64 expression is low and after activation it is significantly up-regulated within a few hours. Once the activation stimulus disappears, CD64 expression returns to its basal level in few days. Moreover, CD64 is relatively stable after blood collection and the assay is straightforward and requires only small sample volume. Last but not least, CD64 expression represents a physiological process which plays a key role in the innate immune response: neutrophils acting as phagocytes (39-43).

In our study, the expression of CD64 on neutrophils was significantly higher in septic patients compared with healthy volunteer's controls.

As far as we know, CD64 expression on leukocytes has been studied in adult patients with SIRS (65), septic shock (66) and abdominal sepsis (39). These studies showed that CD64 expression on neutrophils is upregulated in those patients. Davis et al. showed that CD64 expression on neutrophils differentiated patients with infection from healthy controls with a sensitivity of 88% and a specificity of 77% (39). CD64 expression also effectively differentiates febrile patients from a healthy population, but did not differentiate between patients with bacterial or viral infections (59). Data from the present study also show that CD64 expression on neutrophils is upregulated in septic patients, with a sensitivity of 93% and specificity of 97% to differentiate between patients with sepsis and healthy controls. Livaditi et al. showed that CD64 expression is significantly different among the clinical grades of sepsis (sepsis, severe sepsis and septic shock) (44). To evaluate the expression of CD64 on neutrophils, we used two methodologies: flow cytometry and a routine hematology analyzer CD-Sapphire. By flow cytometry, the number of neutrophil CD64 molecules per cell increases with the severity of sepsis, with the highest levels in septic shock, but does not differentiate patients with septic shock from the other stages of sepsis. Regarding the results obtained with the methodology of the CD-Sapphire, observed an increased expression of CD64 in septic patients compared to the control group, however the results between the different stages of sepsis were similar among them. The progressive increase in the expression of CD64 from the control to the septic shock groups was not observed by the CD-Sapphire methodology, in which we can even observe some overlapping between the control group and the different groups of patients.

With both methodologies CD64 expression is clearly upregulated, but unfortunately, the results were not fully concordant ($p=ns$). A great variation (23%) in the sensitivity between CD-Sapphire methodology (70%), with a NPV of 70%, and conventional flow cytometry (93%), with a NPV of 96%, was observed. All these findings together, confirm that the number of molecules/cell of CD64 is a good biomarker to predict sepsis by flow cytometry, and suggest lower sensitivity of the CD-Sapphire methodology.

Several biomarkers, including C-reactive protein (CRP) and procalcitonin (PCT) have been investigated to differentiate patients with SIRS from those with sepsis. A recent meta-analysis showed that PCT is the most promising biomarker because it is a good specific indicator of bacterial infection (68). PCT is a better marker of sepsis than CRP (69). The course of PCT shows a closer correlation than that of CRP with the severity of infection and organ dysfunction (69,70). In our patients the PCT levels were generally elevated, with marked higher levels in septic shock.

In conclusion, in this study we found that PC levels, neutrophil CD64 molecules per cell and plasma PCT levels confirm the diagnosis and have highly significant correlation with the severity of sepsis, providing additional information for accurate assessment of the severity of the clinical condition.

This study confirms the link between the -1654C/T and -1641A/G polymorphisms in PC gene promoter and circulating PC levels in control group.

On the other hand in respect to the group of patients, we can suggest tendency of the results, in concerning the analysis of genotypes frequencies; this effect, the CC/GG, TT/AA and CT/AG genotypes may be associated with more severe states of sepsis.

DISCUSSÃO

A proteína C (PC) circula no plasma sob a forma de zimogénio, o qual é activado pelo complexo trombina-trombomodulina (TM) na superfície endotelial. A proteína C activada (APC) actua em conjunto com o seu cofactor, a proteína S (PS), e é capaz de exercer a sua actividade anticoagulante através da inactivação proteolítica dos factores Va (FVa) e VIIIa (FVIIIa). A ligação do receptor endotelial da proteína C (EPCR) à PC e ao complexo trombina-TM não só aumenta várias vezes a taxa de activação da PC, como também amplifica as suas actividades anticoagulante e anti-inflamatória (9,11,15).

A APC parece ter um papel central na patogénese da sepsis e disfunção orgânica associada (9,10). Há evidências de que o mau ou insuficiente funcionamento do sistema da PC contribui para a desregulação da coagulação na sepsis (10,19). A PC é consumida durante a evolução da sepsis severa, e a diminuição dos seus níveis plasmáticos pode contribuir significativamente para o desenvolvimento de trombose microvascular e coagulação intravascular disseminada (DIC). As citocinas pro-inflamatórias circulantes induzem a diminuição da expressão da TM e da EPCR, contribuindo para a diminuição da activação da PC.

De acordo com a literatura, em mais de 80% dos doentes com sepsis severa os níveis de PC estão abaixo do limite inferior da normalidade (28,45-46). Diversos estudos demonstraram uma associação entre a diminuição dos níveis de PC e a severidade da doença, indicando um pior prognóstico (47-48,50). Em doentes com sepsis, os níveis baixos de PC parecem estar associados a disfunção multiorgânica e precedem, frequentemente, as alterações clínicas que definem sepsis grave ou choque séptico. Neste sentido, o valor de PC pode ser considerado um indicador de prognóstico (9, 28, 46-51).

Os principais mecanismos responsáveis pelos distúrbios da coagulação durante a resposta inflamatória sistémica são a libertação do factor tecidual (TF), mediado pela geração de trombina, a diminuição da actividade dos mecanismos anticoagulantes fisiológicos e a inibição da fibrinólise, com a consequente deposição de fibrina. A libertação do TF (via extrínseca da coagulação) constitui o principal mecanismo gerador de trombina na sepsis. A sua expressão aumenta na presença de macrófagos/monócitos e células endoteliais expostas a mediadores inflamatórios (5-8). A trombina participa num importante mecanismo de *feedback positivo*, uma vez que desempenha funções cruciais no controlo da hemostase: pró-coagulante, anticoagulante, promotor da proliferação celular e da inflamação e regulador da activação plaquetar.

Neste estudo, 26 em 37 doentes (70%) tinham níveis iniciais de PC abaixo do limite inferior do normal, o que sugere uma deficiência adquirida de PC. A actividade de PC nos doentes com sepsis severa (n=8) ou choque séptico (n=19) era baixa em 21 e normal em 6 doentes. Os dados, sumarizados nos box-plots do Gráfico 1, mostram claramente que os níveis de actividade de PC diminuem com o agravamento dos estados sépticos, corroborando as observações de outros autores (47-51).

A diminuição da concentração de PC na sepsis é multifactorial. A inflamação aguda, como resposta à infecção severa ou trauma, resulta na activação sistémica da coagulação sanguínea. Há um aumento de consumo da PC, como consequência da geração de trombina, aumenta a degradação por enzimas proteolíticas e pode haver diminuição da síntese e/ou da activação, em consequência da diminuição de síntese das proteínas hepáticas (10,27,29).

Alguns doentes podem ter apenas níveis baixos de PC, mas noutros a capacidade de activar a PC em APC pode estar comprometida devido a diminuição da expressão de TM e EPCR a nível do endotélio (29).

O sistema da PC parece ser especialmente sensível à regulação por mediadores inflamatórios (7). Endotoxinas e citocinas pro-inflamatórias são responsáveis pela diminuição da expressão tanto da TM como do EPCR diminuindo assim a capacidade de geração de APC. Além disso a elastase libertada pelos neutrófilos cliva a TM na superfície endotelial gerando uma forma muito menos activa (7, 29).

Recentemente, vários autores mostraram que um haplótipo específico do gene EPCR – haplótipo H3 (rs867186) – resultante da substituição de uma serina por uma glicina no codão 219 (Ser219Gly), está associado a níveis aumentados da fracção solúvel EPCR (sEPCR) e a níveis plasmáticos de PC mais elevados (51-56). Este polimorfismo altera o equilíbrio entre a fracção solúvel e endotelial da EPCR contribuindo para uma menor afinidade da PC se ligar ao endotélio e passar à sua forma activada; além disso, a sEPCR também inibe a actividade anticoagulante da PCA (54-57). Níveis aumentados de sEPCR também têm sido descritos em doentes com sepsis e lúpus eritematoso sistémico (58).

Nos doentes com sepsis, a identificação da deficiente activação da PC pode ter implicações a nível terapêutico (29).

Neste estudo não foi possível avaliar a expressão de TM e EPCR, o que pode introduzir algum desvio na correlação dos resultados com a severidade da doença.

Para além dos níveis de PC, analisaram-se outros três marcadores hemostáticos (fibrinogénio, d-dímeros e plaquetas) aquando da admissão dos doentes com sepsis na Unidade de Cuidados Intensivos (ICU).

Trinta e cinco de 37 doentes apresentaram níveis de fibrinogénio no intervalo da normalidade ou acima deste. Foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo de choque séptico e os outros estadios de sepsis, com níveis mais baixos no choque séptico.

O fibrinogénio, que é uma proteína de fase aguda, está aumentado nas situações inflamatórias e infecções graves. Níveis elevados de fibrinogénio têm sido associados a um aumento do risco de doença trombótica, no entanto, este vai sendo consumido durante a fase de coagulopatia do choque (7,59).

Trombocitopenia foi encontrada em 16 doentes. A sepsis é claramente um factor de risco para trombocitopenia em doentes severamente afectados, e a diminuição da contagem de plaquetas está directamente correlacionada com a severidade da doença. (60). A geração de trombina induz a agregação plaquetar (61) e a excessiva activação da coagulação leva à DIC com consumo de plaquetas e trombocitopenia.

O mecanismo através do qual a trombocitopenia ocorre na sepsis pode ser multifactorial: aumento do consumo, diminuição da produção, processo imune ou consequência da terapêutica com heparina (62). Tipicamente, a contagem do número de plaquetas nos doentes com sepsis diminui durante os primeiros 4 dias de internamento nas UCI (60).

Além do aumento de geração de trombina, a actividade fibrinolítica, avaliada através da quantificação dos d-dímeros, também está aumentada na sepsis. No presente estudo, os valores de d-dímeros estavam elevados em todos os doentes, não se observando diferença significativa entre os grupos.

Neste estudo também foi analisada a influência da variação genotípica de três polimorfismos na região promotora do gene PROC sobre os níveis plasmáticos de PC em correlação com a severidade da doença. Foi ainda avaliada a frequência dos diferentes genótipos em doentes com sepsis relativamente a um grupo controlo.

Estudos prévios demonstraram que a eficácia transcricional do gene da PC é influenciada por três polimorfismos funcionais na região promotora -1654C/T, -1641A/G e -1476A/T (31,36,63). Os polimorfismos -1654C/T e -1641A/G têm sido associados a maior severidade, grau de disfunção orgânica e pior prognóstico na sepsis, no entanto, no presente estudo foram incluídos os três polimorfismos.

Spek et al., Aiach et al. e Binder et al. mostraram que o haplótipo -1654C/-1641G/-1476T, o mais frequente nos europeus ocidentais, estava associado com níveis plasmáticos de PC mais baixos, representando um factor de risco para a trombose venosa profunda (TVP), embolismo pulmonar e sepsis meningocócica (32,36,55). Os mesmos autores também mostraram que o haplótipo TAA em homozigotia está associado com concentrações elevadas de PC, o que confere protecção para o desenvolvimento de sepsis meningocócica. Mais recentemente, Pomp et al., num grande estudo populacional de caso-controlo, investigaram a influência dos dois polimorfismos, PROC -1654C/T e -1641A/G, como factores de risco para a trombose venosa. Os resultados foram de encontro com os publicados anteriormente: o genótipo CC/GG foi associado com níveis mais baixos de PC, quando comparado com os portadores do genótipo TT/AA que apresentavam níveis de PC mais elevados (56). Os nossos dados são concordantes com estes resultados: no grupo controlo, os níveis de actividade de PC nos indivíduos homozigóticos para o genótipo CGT foram cerca de 16% mais baixos do que nos homozigóticos para o genótipo TAA.

Relativamente ao grupo de doentes as diferenças não foram significativas, os doentes com o genótipo CC/GG/TT, um com sepsis e 2 com choque séptico, apresentaram cerca de 30% de PC; os doentes com sepsis, homozigóticos para TAA, tinham níveis médios de PC de 35,5%, enquanto que doentes com o genótipo CT/AG/AT tinham 47%. Oito doentes (2 com sepsis e 6 com choque) duplos heterozigóticos CT/AG/AT apresentavam níveis semelhantes de PC (42%).

Considerando apenas os polimorfismos -1654C/T e -1641A/G, que tem sido correlacionados com a severidade da sepsis, em comparação com os três polimorfismos em simultâneo, não encontramos diferenças significativas nos níveis de PC em cada genótipo nem na distribuição pelos grupos de doentes com sepsis, o que sugere que o polimorfismo -1476 A/T é pouco influente. A correlação dos polimorfismos e dos níveis de PC neste grupo de doentes com sepsis não é fidedigna porque não tem em consideração outros factores que influenciam o curso da doença. Será necessário aumentar o número de doentes em estudo para poder fazer uma avaliação mais correcta.

De acordo com Scopes et al., a eficácia transcricional do gene PROC é condicionada pelos polimorfismos nas posições -1654 e -1641 (31). Dentro do grupo controlo a média dos níveis de PC foi 16% mais elevada nos indivíduos com o genótipo TT/AA relativamente aos portadores do genótipo CC/GG, o que vai de encontro com os dados já publicados (36, 56). Por outro lado, no grupo de doentes com sepsis os genótipos CC/GG, TT/AA e CT/AG estavam associados a níveis mais baixos de PC e a

uma maior incidência de choque séptico. Embora estes resultados sejam preliminares, e necessitem de ser validados com o estudo de um maior número de doentes, sugerem uma tendência para a associação dos genótipos CC/GG, TT/AA e CT/AG com os estados mais severos de sepsis.

Num estudo recente, Walley e Russell mostraram, numa coorte de doentes com sepsis (n=62), uma associação entre o genótipo -1641AA e uma menor sobrevivência, elevada disfunção orgânica e aumento da resposta inflamatória sistémica (33). Qi Xing Chen e os seus colaboradores (34) verificaram que, na população chinesa Han, que o haplótipo -1654C/-1641A estava associado a maior disfunção orgânica e pior prognóstico em doentes com sepsis severa. Contudo a frequência alélica dos SNPs -1654C e -1641A foi idêntica no grupo de doentes com sepsis severa e no grupo controlo, o que sugere que nenhum dos polimorfismos contribui por si só para a susceptibilidade a sepsis severa. O nosso estudo mostrou que nos grupos de doentes com sepsis e no grupo controlo a prevalência do genótipo -1641AA não difere significativamente e o haplótipo CA (-1654/-1641) ocorre com elevada frequência em todos os grupos sem diferença significativa entre eles, não estando associado com a severidade da doença. Nos doentes com sepsis, o haplótipo mais frequente foi o -1654C/-1641A/-1476A, seguido do haplótipo TAA..

A expressão do CD64 nos neutrófilos tem sido alvo de vários estudos ao longo dos últimos anos como um biomarcador de infecção e sepsis. As suas características fazem-no um marcador adequado para aplicação clínica: nos neutrófilos não activados a expressão de CD64 é baixa e após activação torna-se rapidamente positivo em poucas horas. Uma vez que o estímulo de activação desaparece, a expressão do CD64 retoma os seus níveis basais em poucos dias. Além disso o CD64 é relativamente estável após a colheita e o ensaio é simples requerendo pouco volume de amostra. Por último, mas não menos importante, a expressão do CD64 nos neutrófilos representa um processo fisiológico que desempenha um papel fundamental na resposta imune inata: os neutrófilos na qualidade de fagócitos (39-43).

Neste estudo, a expressão do CD64 nos neutrófilos foi significativamente mais elevada no grupo de doentes com sepsis comparado com o grupo controlo.

A expressão do CD64 nos neutrófilos tem sido estudada em doentes adultos com SIRS (65), choque séptico (66) e com sepsis abdominal (39) e foi demonstrado que a expressão de CD64 em neutrófilos está aumentada nesses grupos de doentes. Um estudo de Davis et al., mostrou que a expressão de CD64 nos neutrófilos permite

diferenciar doentes com infecção de controlos saudáveis, com uma sensibilidade de 88% e uma especificidade de 77% (39). A expressão de CD64 diferenciou doentes febris de indivíduos saudáveis, mas não diferenciou doentes com infecções bacterianas de doentes com infecções virais (59). Os dados do presente estudo mostraram que a expressão do CD64 nos neutrófilos está aumentada nos doentes com sepsis, e tem uma sensibilidade de 93% e uma especificidade de 97% para diferenciar entre doentes com sepsis e controlos saudáveis.

A expressão do CD64 pelos neutrófilos tem sido investigada em diferentes estadios de sepsis isoladamente, mas menos no espectro de sepsis num todo. Neste sentido, Livaditi et al. investigaram a expressão do CD64 nos neutrófilos como marcador de severidade e factor preditivo de mortalidade. Estes autores mostraram, com base nos resultados de uma única determinação nas primeiras 24h de sepsis, que a expressão de CD64 é significativamente diferente nos três estadios de sepsis (sepsis, sepsis severa e choque séptico), correlacionando-se com a severidade. Verificaram ainda que a elevada expressão de CD64 nos neutrófilos parece ser um preditor precoce de mortalidade nos doentes com sepsis (44).

Neste estudo, para avaliarmos a expressão de CD64 nos neutrófilos utilizámos duas metodologias, citometria de fluxo e um contador automático CD-Sapphire, para medir a intensidade de fluorescência do anticorpo monoclonal anti-CD64 ligado aos neutrófilos. Para minimizar as flutuações de fluorescência ao longo do tempo do citómetro de fluxo, convertimos o valor de intensidade média de fluorescência em moléculas/célula utilizando esferas que permitem traçar uma curva de calibração; não é possível realizar esta técnica no CD-Sapphire. Utilizando citometria de fluxo observámos que o número de moléculas de CD64 por neutrófilo aumenta com a severidade da sepsis, com níveis de expressão mais elevados no choque séptico. No entanto, embora se tenha observado um aumento progressivo de expressão de CD64 com o agravamento do estado séptico, não foi possível estabelecer um *cut-off* para cada estadio da doença. Relativamente aos resultados obtidos com a metodologia do CD-Sapphire, observámos um aumento de expressão de CD64 nos doentes com sepsis relativamente ao grupo controlo, contudo os resultados entre os diferentes estadios de sepsis foram semelhantes entre si. O aumento da expressão do CD64 dos grupos controlo para o choque séptico não foi observado pela metodologia do CD-Sapphire, em que pudemos observar alguma sobreposição entre o grupo controlo e os diferentes grupos de doentes. Além disso, o número de moléculas de CD64 por neutrófilo estava aumentado pela metodologia de citometria de fluxo em 15

doentes com sepsis, que pela metodologia do CD-Sapphire apresentavam uma expressão normal.

Com ambas a metodologias a expressão do CD64 está claramente aumentada nos doentes com sepsis relativamente ao grupo controlo, no entanto, os resultados não foram totalmente concordantes ($p=ns$). Observou-se uma grande variação (23%) na sensibilidade entre a metodologia do CD-Sapphire (70%), com um valor preditivo negativo (VPN) de 70% e a citometria de fluxo convencional (93%), com um VPN de 96%.

Todos estes resultados, em conjunto, confirmam que o número de moléculas de CD64/neutrófilo é um bom biomarcador de sepsis utilizando a citometria de fluxo, e sugerem uma menor sensibilidade da metodologia do CD-Sapphire. O recurso a esferas de calibração para obter o número de moléculas/célula permite comparar resultados ao longo do tempo, entre grupos e em diferentes equipamentos, o que faz esta técnica mais sensível e específica.

Diversos biomarcadores, incluindo a proteína C reactiva (CRP) e a procalcitonina (PCT), têm sido investigados no sentido de diferenciar doentes com SIRS dos outros doentes com sepsis. Uma meta análise recente mostrou que a PCT apresenta maior sensibilidade e especificidade relativamente à CRP, tornando a PCT um biomarcador mais promissor, pois é um indicador específico de infecção bacteriana (68). No contexto de sepsis, tem sido demonstrado que a PCT é melhor marcador da doença do que a CRP. A evolução da PCT apresenta uma correlação mais estrita do que a CRP, com a gravidade da doença e disfunção orgânica (69,70). Nos nossos doentes, os níveis de PCT estavam aumentados na globalidade, com níveis marcadamente mais elevados no choque séptico.

CONCLUSÃO

Neste grupo de doentes com sepsis, avaliados no momento em que deram entrada na unidade de cuidados intensivos (UCI), os níveis de proteína C (PC), o número de moléculas de CD64 / neutrófilo e os níveis de procalcitonina (PCT) permitem confirmar o diagnóstico. Observou-se que estes três biomarcadores correlacionam-se significativamente com a severidade da sepsis, fornecendo uma informação adicional fidedigna para a avaliação da gravidade do quadro clínico. O grupo de doentes com choque séptico apresentou níveis de PC diminuídos, elevada expressão de CD64 nos neutrófilos e níveis elevados de PCT.

Relativamente aos restantes marcadores de infecção quantificados, o fibrinogénio, d-dímeros e proteína C reactiva (CRP), não mostraram interesse para o diagnóstico diferencial.

Este estudo confirmou a correlação entre os polimorfismos -1654C/T e -1641A/G da região promotora do gene PROC e os níveis plasmáticos de PC no grupo controlo com níveis significativamente mais baixos (-16%) nos indivíduos portadores do genótipo CC/GG/TT relativamente aos indivíduos com o genótipo TT/AA/AA.

Por outro lado, no presente estudo observou-se que a variação genotípica dos polimorfismos funcionais -1654C/T e -1641A/G na região promotora do gene PROC pode influenciar a susceptibilidade para estadios de sepsis mais severos. Assim, embora estes resultados ainda sejam preliminares e o estudo ainda esteja em curso, devido ao reduzido número de doentes, podemos sugerir tendência dos resultados relativa à análise da distribuição dos genótipos; neste sentido, os genótipos CC/GG, TT/AA e CT/AG parecem estar associados a estadios de maior severidade de sepsis.

REFERÊNCIAS

1. Lever A, Mackenzie I. Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. *BMJ*. 2007 Oct 27;335(7625):879-83.
2. Levy MM et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. 2003 Apr; 31(4):125-6.
3. Calandra T, Cohen J; The international sepsis forum consensus conference on definitions of infection in the intensive care unit. *Crit Care Med*. 2005 Jul;33(7):1538-48.
4. Levi M, van der Poll T. Inflammation and coagulation. *Crit Care Med*. 2010 Feb; 38(2 Suppl):S26-34.
5. Esmon CT, et al. Inflammation, sepsis, and coagulation. *Haematologica*. 1999 Mar;84(3):254-9.
6. Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol*. 2008 Mar;83(3):536-45.
7. Esmon CT. The interactions between inflammation and coagulation. *Br J Haematol*. 2005 Nov;131(4):417-30.
8. Esmon CT. Crosstalk between inflammation and thrombosis. *Maturitas*. 2004 Apr 15;47(4):305-14.
9. Lee A, O'Brien et al. Activated protein C and sepsis. *Frontiers in Bioscience*. 2006 Jan; 11, 676-698.
10. Levi M. Activated protein C in sepsis: a critical review. *Curr Opin Hematol*. 2008 Sep;15(5):481-6.
11. Griffin JH, et al. Activated protein C. *J Thromb Haemost*. 2007 Jul;5 Suppl 1:73-80.
12. Foster DC, Yoshitake S, Davie EW. The nucleotide sequence of the gene for human protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Jul;82(14):4673-7.
13. Plutzky J, Hoskins JA, Long GL, Crabtree GR. Evolution and organization of the human protein C gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Feb;83(3):546-50.
14. Pavlova A, Geisen C, Lim-Eimer M, Watzka M, Seifried E, Oldenburg J. SNP map of the protein C gene. In: Scharrer I, Scharrer W, editores. 34th Hemophilia Symposium 2003; Hamburg. Heidelberg: Springer; 2005
15. Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. *Blood*. 2007 Apr 15;109(8):3161-72.
16. Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor. *Thromb Haemost*. 2000 May;83:639-643.
17. Esmon CT. Protein C anticoagulant system-anti-inflammatory effects. *Semin Immunopathol*. 2011 Aug 6.

18. Mosnier LO, Griffin JH. Protein C anticoagulant activity in relation to anti-inflammatory and anti-apoptotic activities. *Front Biosci*. 2006 Sep 1;11:2381-99.
19. Neyrinck AP, Liu KD, Howard JP, Matthay MA. Protective mechanisms of activated protein C in severe inflammatory disorders. *Br J Pharmacol*. 2009 Oct;158(4):1034-47.
20. Dahlbäck B, Villoutreix BO. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Jul;25(7):1311-20.
21. Dahlbäck B, Villoutreix BO. The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett*. 2005 Jun 13;579(15):3310-6.
22. Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW. Gene expression profile of antithrombotic protein C defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem*. 2001 Apr 6;276(14):11199-203.
23. Esmon CT. Role of coagulation inhibitors in inflammation. *Thromb Haemost*. 2001 Jul;86(1):51-6.
24. Sarangi PP, Lee HW, Kim M. Activated protein C action in inflammation. *Br J Haematol*. 2010 Mar;148(6):817-33.
25. Feistritzer C, Riewald M. Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1 dependent shingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation. *Blood*. 2005 Apr 15; 105(8):3178-84.
26. Shorr AF, et al. Protein C concentrations in severe sepsis: an early directional change in plasma levels predicts outcome. *Crit Care*. 2006;10(3):R92.
27. Levi M, van der Poll T. Recombinant human activated protein C: current insights into its mechanism of action. *Crit Care*. 2007;11 Suppl 5:S3.
28. Yan SB, Helterbrand JD, Hartman DL, Wright TJ, Bernard GR. Low levels of protein C are associated with poor outcome in severe sepsis. *Chest*. 2001 Sep;120(3):915-22.
29. Liaw PC et al. Patients with severe sepsis vary markedly in their ability to generate activated protein C. *Blood*. 2004; Dec 15;104(13):3958-64.
30. Spek CA, Poort SR, Bertina RM, Reitsma PH. Determination of the allelic and haplotype frequencies of three polymorphisms in the promoter region of the human protein C gene. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1994 Apr;5(2):309-11.
31. Scopes D, Berg LP, Krawczak M, Kakkar VV, Cooper DN. Polymorphic variation in the human protein C (PROC) gene promoter can influence transcriptional efficiency in vitro. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1995 Jun;6(4):317-21.

-
32. Binder A, et al. Protein C promoter polymorphisms associate with sepsis in children with systemic meningococemia. *Hum Genet.* 2007 Sep;122(2):183-90.
 33. Walley KR, Russell JA. Protein C -1641 AA is associated with decreased survival and more organ dysfunction in severe sepsis. *Crit Care Med.* 2007 Jan;35(1):12-7.
 34. Chen QX, et al. Protein C -1641A/-1654C haplotype is associated with organ dysfunction and the fatal outcome of severe sepsis in Chinese Han population. *Hum Genet.* 2008 Apr;123(3):281-7.
 35. Sutherland AM, Walley KR. Bench-to-bedside review: Association of genetic variation with sepsis. *Crit Care.* 2009;13(2):210
 36. Spek CA, Koster T, Rosendaal FR, Bertina RM, Reitsma PH. Genotypic variation in the promoter region of the protein C gene is associated with plasma protein C levels and thrombotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995 Feb;15(2):214-8.
 37. Schiff DE, Rae J, Martin TR, Davis BH, Curnutte JT. Increased phagocyte Fc gammaRI expression and improved Fc gamma-receptor-mediated phagocytosis after in vivo recombinant human interferon-gamma treatment of normal human subjects. *Blood.* 1997 Oct 15;90(8):3187-94.
 38. Davis BH, Olsen SH, Ahmad E, Bigelow NC. Neutrophil CD64 is an improved indicator of infection or sepsis in emergency department patients. *Arch Pathol Lab Med.* 2006 May;130(5):654-61.
 39. Elghetany MT. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. *Blood Cells Mol Dis* 2002;28:260-74.
 40. Elghetany MT, Ge Y, Patel J, Martinez J, Uhrova H. Flow cytometric study of neutrophilic granulopoiesis in normal bone marrow using an expanded panel of antibodies: correlation with morphologic assessments. *J Clin Lab Anal.* 2004;18(1):36-41.
 41. Davis BH. Improved diagnostic approaches to infection / sepsis detection. *Expert Rev Mol Diagn* 2005;5:193-207.
 42. Song SH, Kim HK, Park MH, Cho HI. Neutrophil CD64 expression is associated with severity and prognosis of disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res.* 2008;121(4):499-507.
 43. Hoffmann JJ. Neutrophil CD64: a diagnostic marker for infection and sepsis. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(8):903-16.
 44. Livaditi O, et al. Neutrophil CD64 expression and serum IL-8: sensitive early markers of severity and outcome in sepsis. *Cytokine.* 2006 Dec;36(5-6):283-90.
 45. Shorr AF, Bernard GR, et al. Protein C concentrations in severe sepsis: an early directional change in plasma levels predicts outcome. *Crit Care.* 2006;10(3):R92.

-
46. Shorr AF, Nelson DR, et al. Protein C: a potential biomarker in severe sepsis and a possible tool for monitoring treatment with drotrecogin alfa (activated). *Crit Care*. 2008;12(2):R45.
 47. Fisher CJ Jr, Yan SB. Protein C levels as a prognostic indicator of outcome in sepsis and related diseases. *Crit Care Med*. 2000;28:S49-S56.
 48. Hesselvik JF, Malm J, Dahlback B, Blomback M. Protein C, protein S and C4b binding protein in severe infection and septic shock. *Thromb Haemost*. 1991;65:126-129.
 49. Phillippe J, Offner F, Declerck PJ, Leroux-Roels G, Vogelaers D. Fibrinolysis and coagulation in patients with infectious disease and sepsis. *Thromb Haemost*. 1991;65:291-295.
 50. Brunkhorst F, Sakr Y, Hagel S, Reinhart K. Protein C concentrations correlate with organ dysfunction and predict outcome independent of the presence of sepsis. *Anesthesiology*. 2007 Jul;107(1):15-23.
 51. Saposnik B, Reny JL, Gaussem P, Emmerich J, Aiach M, Gandrille S. A haplotype of the EPCR gene is associated with increased plasma levels of sEPCR and is a candidate risk factor for thrombosis. *Blood*. 2004 Feb 15;103(4):1311-8.
 52. Uitte de Willige S, Van Marion V, Rosendaal FR, Vos HL, de Visser MC, Bertina RM. Haplotypes of the EPCR gene, plasma sEPCR levels and the risk of deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2004 Aug;2(8):1305-10.
 53. Medina P, Navarro S, Estellés A, España F. Polymorphisms in the endothelial protein C receptor gene and thrombophilia. *Thromb Haemost*. 2007 Sep;98(3):564-9.
 54. Gandrille S. Endothelial cell protein C receptor and the risk of venous thrombosis. *Haematologica*. 2008 Jun;93(6):812-6.
 55. Liaw PC, Neuenschwander PF, Smirnov MD, Esmon CT. Mechanisms by which soluble endothelial cell protein C receptor modulates protein C and activated protein C function. *J Biol Chem*. 2000 Feb 25;275(8):5447-52.
 56. Pintao MC, Roshani S, de Visser MC, et al. High levels of protein C are determined by PROCR haplotype 3. *J Thromb Haemost*. 2011 May;9(5):969-76.
 57. Dennis J, Johnson CY, Adediran AS, et al. The endothelial protein C receptor (PROCR) Ser219Gly variant and risk of common thrombotic disorders: a HuGE review and meta-analysis of evidence from observational studies. *Blood*. 2012 Mar 8;119(10):2392-400.
 58. Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ, Carson CW, D'Angelo A, Della Valle P, Esmon CT. Plasma levels of endothelial cell protein C receptor are elevated in patients with sepsis and systemic lupus erythematosus: lack of correlation with thrombomodulin suggests involvement of different pathological processes. *Blood*. 1998 Jan 15;91(2):725-7.

-
59. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999; 340:448–454
 60. Levi M. Platelets at a crossroad of pathogenic pathways in sepsis. *J Thromb Haemost.* 2004 Dec;2(12):2094-5.
 61. Levi M, Toh CH, Thachil J, Watson HG. Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation. British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol.* 2009 Apr;145(1):24-33.
 62. Levi M. Platelets in sepsis. *Hematology.* 2005;10 Suppl 1:129-31. Review.
 63. Aiach M et al. Complex association of protein C gene promoter polymorphism with circulating protein C levels and thrombotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Jun;19(6):1573-6.
 64. Pomp ER, Doggen CJ, Vos HL, Reitsma PH, Rosendaal FR. Polymorphisms in the protein C gene as risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 2009 Jan;101(1):62-7.
 65. Qureshi SS, Lewis SM, Gant VA et al. Increased distribution and expression of CD64 on blood polymorphonuclear cells from patients with the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Clin. Exp. Immunol.* 2001; 125: 258–65.
 66. Fischer G, Schneider EM, Moldawer LL et al. CD64 surface expression on neutrophils is transiently upregulated in patients with septic shock. *Intensive Care Med.* 2001; 27: 1848–52.
 67. Nuutila J, Hohenthal U, Laitinen I et al. Simultaneous quantitative analysis of FcγRI (CD64) expression on neutrophils and monocytes: a new, improved way to detect infections. *J. Immunol. Methods* 2007; 328: 189–200.
 68. Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2004 Jul 15;39(2):206-17
 69. Luzzani A, Polati E, Dorizzi R, Rungtatscher A, Pavan R, Merlini A Comparison of procalcitonin and C-reactive protein as markers of sepsis. *Crit Care Med* 2003;31:1737–41.
 70. Castelli GP, Pognani C, Cita M, Stuardi A, Sgarbi L, Paladini R. Procalcitonin, C-reactive protein, white blood cells and SOFA score in ICU: diagnosis and monitoring of sepsis. *Minerva Anestesiol.* 2006 Jan-Feb;72(1-2):69-80.